

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



**Vliv lipopolysacharidu a muramyl dipeptidu na
lymfocyty mléčné žlázy jalovic**
Disertační práce

Školitel:
doc. Dr. Ing. Zdeněk Havlíček

Vypracoval:
Bc. Ing. Eliška Kabourková

Školitel specialista:
Ing. Petr Sláma, Ph.D.

Brno 2016

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem disertační práci na téma **Vliv lipopolysacharidu a muramyl dipeptidu na lymfocyty mléčné žlázy jalovic** vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby 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 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 svému školiteli doc. Dr. Ing. Zdeňkovi Havlíčkovi a svému školiteli specialistovi Ing. Petru Slámovi, Ph.D. za čas obětovaný této práci, kterého si nesmírně vážím. Dále děkuji doc. Ing. Martině Lichovnickové, Ph.D. za báječný nápad. V neposlední řadě děkuji své rodině. Děkuji.

Zpracovaná disertační práce byla finančně podpořena z prostředků specifického vysokoškolského výzkumu prostřednictvím projektu IGA AF MENDELU TP3/2015.

ABSTRAKT

Cílem práce bylo zjistit, zda intramamární aplikace bakteriálního toxinu lipopolysacharidu a muramyl dipeptidu jako strukturní jednotky peptidoglykanu ovlivňují apoptózu lymfocytů, expresi receptoru CD44 na lymfocytech a produkci zánětlivých cytokinů (TNF- α , IL-4, IL-10 a TGF β 1) v průběhu zánětu mléčné žlázy. V experimentech byl použit lipopolysacharid bakterie *E. coli* o koncentraci 5 μ g a syntetický analog muramyl dipeptidu o koncentraci 500 μ g. Zánětlivá odpověď byla analyzována ve 4 časových bodech (24, 48, 72 a 168 hodin) po stimulaci mléčné žlázy na 8 klinicky zdravých jalovicích, kříženkách holštýnského a českého strakatého plemene. Jako kontrola byl použit pufrovaný fyziologický roztok. Laváže mléčných žláz byly analyzovány průtokovým cytometrem, kde byla stanovena apoptóza lymfocytů a pozitivita lymfocytů na CD44. Dále byly zjištěny koncentrace výše uvedených cytokinů metodou ELISA, a to ve stanovených časových bodech. Po vyhodnocení výsledků bylo zjištěno, že lipopolysacharid a muramyl dipeptid pravděpodobně vyvolávají apoptózu lymfocytů s maximem 48 hodin po stimulaci mléčné žlázy. Vysoká pozitivní korelace mezi apoptózou lymfocytů a expresí receptoru CD44 naznačuje účast tohoto receptoru v průběhu apoptózy lymfocytů. Naměřené koncentrace cytokinů nasvědčují o jejich účasti při ovlivnění apoptózy v průběhu zánětu mléčné žlázy.

Klíčová slova: zánět, mastitida, dojený skot, apoptóza, CD44, cytokiny, průtoková cytometrie, ELISA

ABSTRACT

The objective of this study was to get a better knowledge of lymphocyte apoptosis, surface expression of CD44 on lymphocytes and inflammatory cytokine production (TNF- α , IL-4, IL-10, and TGF β 1) throughout inflammatory response of bovine mammary gland caused by bacterial toxin lipopolysaccharide (LPS) and muramyl dipeptide as a structural unit of peptidoglycan (MDP). In the experiments, there were used LPS and MDP at the specified concentrations (5 μ g and 500 μ g, respectively). The inflammatory response was analysed at selected time points (24, 48, 72, and 168 h) following stimulation of the mammary gland. As a control, the same volumes of physiological saline solution was used. The lymphocyte apoptosis and the surface expression of the CD44 on the lymphocytes were detected in the mammary gland lavages collected from the 8 clinically healthy virgin Holstein x Czech Pied heifers by flow cytometry. Further, it was analysed the concentrations of the cytokines at the same selected time points by an ELISA method. The intramammary instillation using LPS and MDP resulted in the highest lymphocyte apoptosis 48 hours after the inductor challenge. The receptor CD44 was highly correlated with the lymphocyte apoptosis occurrence. It is likely that CD44 receptor is present throughout lymphocyte apoptosis process. The cytokine concentrations obtained indicate that the cytokines may play a role in apoptosis during mammary gland inflammation.

Key words: inflammation, mastitis, dairy cattle, apoptosis, CD44 cytokines, flow cytometry, ELISA

OBSAH

ABSTRAKT.....	4
ABSTRACT.....	5
1 ÚVOD	8
2 CÍL PRÁCE	9
3 LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	10
3.1 Mléčná žláza	10
3.2 Specifika imunitního systému u skotu	11
3.2.1 Obranné mechanismy mléčné žlázy	12
3.3 Lymfocyty.....	17
3.3.1 Receptory lymfocytů.....	18
3.4 Mastitidy	20
3.4.1 Zánět.....	20
3.4.2 Bovinní mastitidy	21
3.4.3 Původci mastitid.....	22
3.5 Bakterie jako původci mastitid.....	23
3.5.1 Gram-pozitivní bakterie	23
3.5.2 Gram-negativní bakterie.....	24
3.6 Apoptóza	25
3.6.1 Apoptóza lymfocytů.....	26
3.7 Cytokiny.....	28
3.7.1 Rozdělení cytokinů.....	28
3.7.2 Cytokiny produkované lymfocyty.....	31
4 MATERIÁL A METODIKA.....	32
4.1 Pokusná zvířata a design experimentu	32
4.2 Detekce apoptózy lymfocytů.....	33
4.3 Detekce receptoru CD44	36
4.4 Detekce cytokinů.....	38
4.4.1 Postup analýzy TNF- α	38
4.4.2 Postup analýzy IL-4	39
4.4.3 Postup analýzy IL-10	40
4.4.4 Postup analýzy TGF β 1	41

4.5 Statistika.....	42
5 VÝSLEDKY	43
5.1 Zánětlivá odpověď mléčné žlázy	43
5.2 Apoptóza lymfocytů v průběhu zánětlivé odpovědi	44
5.3 Podíl CD44+ lymfocytů v průběhu zánětlivé odpovědi.....	45
5.4 Produkce cytokinů v průběhu zánětlivé odpovědi mléčné žlázy	48
5.4.1 Produkce TNF- α	48
5.4.2 Produkce IL-4.....	49
5.4.3 Produkce IL-10.....	50
5.4.4 Produkce TGF- β 1.....	51
6 DISKUSE.....	52
7 ZÁVĚR	62
8 POUŽITÁ LITERATURA.....	63

1 ÚVOD

Záněty mléčné žlázy, nebo-li také mastitidy, představují jednu z nejzávažnějších produkčních chorob dojeného skotu, jelikož mohou mít významný ekonomický dopad na celý chov. V případě výskytu mastitid ve stádě dochází nejen k samotnému poklesu produkce mléka, ale i kvality a možnosti jeho zpeněžení. Dále jsou s mastitidami spojeny zvýšené náklady spojené s veterinární péčí a užitými léčivy. V neposlední řadě pak dochází k předčasné selekci laktujících dojnic ze stáda.

V průběhu zánětu mléčné žlázy hrají důležitou roli leukocyty, které během zánětu putují z krve do mléčné žlázy. Jejich životnost se odráží ve správném průběhu mastitid, neboť pouze životaschopné buňky mohou vykonávat své funkce.

Programovaná buněčná smrt leukocytů zastává důležitou funkci při zánětlivé odpovědi mléčné žlázy. V současné době je dostupných mnoho informací o apoptóze neutrofilů, popř. makrofágů v průběhu zánětu mléčné žlázy, ale jen minimum těchto informací o apoptóze lymfocytů, která je zajisté v procesu zánětu velmi významná.

Receptory na leukocytech se podílejí na spouště procesů včetně samotného zánětu. Role receptoru CD44 u neutrofilů je již zmapována, ale CD44 pozitivní lymfocyty v rámci mastitid zatím popsány nebyly. Je možné, že se mohou podílet na apoptóze u lymfocytů.

Cytokiny jsou proteiny sloužící ke komunikaci mezi leukocyty. Cytokinová síť v rámci mastitid je velmi spletitá. Cytokiny mohou ovlivňovat apoptózu lymfocytů a také expresi receptorů na těchto buňkách. Z uvedených důvodů se předkládaná disertační práce zaměřuje na apoptózu lymfocytů, expresi CD44 na lymfocytech a analýzu zánětlivých cytokinů, v jejichž prostředí uvedené procesy probíhají.

2 CÍL PRÁCE

V této disertační práci byl použit lipopolysacharid (LPS) a muramyl dipeptid (MDP) pro vyvolání zánětlivé odpovědi mléčné žlázy jalovic. LPS byl vybrán jako endotoxin produkovaný Gram-negativními bakteriemi a MDP jako základní strukturální jednotka peptidoglykanu Gram-pozitivních bakterií. Zánětlivá odpověď mléčné žlázy byla dále studována s ohledem na apoptózu lymfocytů, expresi CD44 receptorů na lymfocytech a produkci zánětlivých cytokinů.

Cíle práce byly následující:

1. Zjistit, zda jsou LPS a MDP schopné modulovat apoptózu lymfocytů v průběhu zánětlivé odpovědi mléčné žlázy.
2. Zjistit, zda LPS a MDP vyvolávají expresi receptoru CD44 na lymfocytech.
3. Zjistit, zda LPS a MDP vyvolávají produkci TNF- α , IL-4, IL-10 a TGF β 1 leukocyty mléčné žlázy během zánětlivé odpovědi.
4. Posoudit vztahy mezi apoptózou lymfocytů a expresí receptoru CD44 na lymfocytech.
5. Posoudit vztahy mezi produkcí cytokinů a apoptózou lymfocytů.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Mléčná žláza

Mléčná žláza je pozměněná kožní žláza vytvářející se již v raném embryonálním období. Fylogenezí došlo u dojnic k vývinu čtyř funkčně samostatných mléčných žláz. Ty jsou sdruženy ve vemeni. Levá polovina je od pravé poloviny oddělena závěsným vazem vemene, který představuje pevnou střední přepážku nazývanou podélná mezivemenní rýha. Vazivová membrána, nacházející se mezi přední a zadní čtvrtí vemene, pak člení obě čtvrti. Jedná se tak o samostatné oddíly, kdy důsledkem je, že vytvořený mléčný sekret jedné čtvrti nemůže přejít do prostoru čtvrti druhé. Z této skutečnosti vyplývá, že rovněž případné onemocnění se vyskytuje v každé čtvrti nezávisle na čtvrti jiné (Kopecký et al., 1981).

Mléčná žláza je určena především k zabezpečení výživy mláďat. Jedná se o orgán zajišťující u savců plnohodnotnou výživu a zároveň také ochranu mláďat před případnou infekcí (Toman et al., 2000). Některé antibakteriální enzymy, jako je xantin oxidoreduktáza, nebo lysozym, se přímo evolučně podílely na výživové hodnotě mléka (Vorbach et al., 2006). Je-li potřeba, výživa i ochrana mláďete probíhá dokonce i na úkor matky. Z biologického hlediska je obrana samotné matky před infekcí až funkcí sekundární. Obranné mechanismy mléčné žlázy nejsou považovány za dostatečné. Tato nedostatečnost ochrany je navíc dále prohlubována nejen ve spojení s neustále se zvyšující šlechtitelsky podmíněnou produkcí mléka u dojeného skotu (Toman et al., 2000), ale také s technologickými pokroky při získávání mléka pro lidskou výživu (Sordillo et al., 1997). Imunita mléčné žlázy není po celou dobu života konstantní, ale mění se v čase. Nejméně odolná je mléčná žláza během své aktivní involuce a v období puerperia (Toman et al., 2000).

Aktivní involuce mléčné žlázy je vyvolána zaprahnutím dojnice vedoucí k rychlým změnám v sekreci mléčné žlázy. Dochází k rozsáhlým změnám nejen v uspořádání samotné tkáně mléčné žlázy, ale také ke změnám jejího složení, které se objevuje v období přechodu z období laktace do období zaprahnutí (Shamay et al., 2003). Nastává pokles aktivity sekrečních buněk, zmenšuje se jejich počet a mnohé z nich úplně zanikají. Stejně tak mléčné alveoly a tubuly ztrácí svou velikost, lumen a z části ubývají. Následuje zúžení vývodných cest a redukce žláznatého parenchymu na téměř dvě třetiny jeho

původního objemu. Zmnoží se však řídké vazivo a především tuková tkáň. Mléčná žláza se tak dostává do nefunkčního stavu (Marvan et al., 2007). Během tohoto období, které trvá okolo 30 dnů po začátku zaprahnutí, se sekret mléčné žlázy stává málo objemný, vodnatý, kalný a bohatý na obsah leukocytů, jejichž počet je větší než $5 \times 10^6/\text{ml}$. Tyto změny sekretu jsou dále doprovázeny výrazným poklesem obsahu mléčného cukru a tuku. Paralelně dochází ke zvýšené koncentraci antibakteriální bílkoviny laktoferinu a imunoglobulinů G jako součásti přirozené imunity (Shamay et al., 2003).

V období puerperia počet T buněk a produkce interferonu gama (IFN- γ) v mononukleárních buňkách periferní krve (PBMC) klesá (Ishikawa et al., 1994). Přestože přesný mechanismus a faktory tohoto fenoménu nebyly zatím objasněny, pokles v populaci a funkci T buněk je považován jako příčina zvýšené vnímavosti mléčného skotu k infekcím během puerperia (Ohtsuka et al., 2010).

3.2 Specifika imunitního systému u skotu

Hlavní buněčnou populací v thymu jsou T lymfocyty, a to asi z 97 %. Zbýlé 3 % představují dendritické buňky. Vnější kortex thymu obsahuje dvojité negativní CD4⁻CD8⁻ buňky. V samotném kortexu se nacházejí z 50 až 60 % z celkové populace buněk dvojité pozitivní CD4⁺CD8⁺ buňky. Dřeň disponuje dozrávajícími CD4⁺ nebo CD8⁺ a gama delta lymfocyty. Vysoký podíl $\gamma\delta$ T lymfocytů je také v červené pulpě sleziny. Tyto buňky u skotu ve slezině neexprimují znak WC1 (Toman et al., 2000).

U telat se lymfatickou tkání v ileu formuje tzv. kontinuální Peyerův plak. Vytváří se zde primární imunoglobulinový repertoár. Během pohlavního dospívání involuje (Toman et al., 2000).

Skot má vysoký počet perivaskulárních makrofágů v plicích. Krev skotu je tzv. lymfocytární, kdy lymfocyty v ní početně převažují nad neutrofilními granulocyty a ostatními leukocyty. Granule neutrofilů mají velmi nízkou hladinu lysozymu ve srovnání s ostatními savci. Žírné buňky skotu, které se hojně vyskytují v respiračním traktu, mají vysoký obsah dopaminu a jiné kontrolní mechanismy uvolňování mediátorů ve srovnání s ostatními savci (Toman et al., 2000).

U skotu byly nalezeny subpopulace lymfocytů Th1 a Th2 produkující cytokiny. Specifickým cytokinem skotu je interferon typu I označovaný IFN- τ . Působí v endometriu jako signál k rozpoznání gravidity (Toman et al., 2000). Jedná se o cytokin

disponující antivirovými, antiproliferativními a imunomodulačními aktivitami podobnými aktivitám typu I IFN (Pontzer et al., 1991). Dříve byl považován za produkt pouze $CD4^+$ T_H typu I ($Th1$) lymfocytů, $CD8^+$ cytotoxických lymfocytů a NK buněk (Bach et al., 1997). Bylo prokázáno, že ho mohou produkovat také B buňky, NKT buňky a profesionální antigen-prezentující buňky (Carnaud et al., 1999).

Izotypové třídy imunoglobulinů objevené u skotu jsou následující: IgM, IgG, IgA a IgE. IgG má tři podtřídy: IgG1, IgG2 a IgG3. Imunoglobulin IgD zatím u skotu prokázán nebyl. Členění do podtříd je pro skot exkluzivní, čili neznačí stejné funkce u stejně značených podtříd jiných zvířat. IgM a IgG2 jsou primárními izotypy se schopností opsonizace, zatímco u ostatních druhů to je IgG1 (Toman et al., 2000).

Dalším specifíkem je převaha IgG1 molekul oproti IgA (Toman et al., 2000). Bovinní IgA je souhlasný s humánním IgA. Tento imunoglobulin je minoritně zastoupený v kolostru. Majoritně se vyskytuje ve většině exkretů jako jsou sliny, sperma, slzy a v nosních a gastrointestinálních sekretech. V séru byly objeveny 2 formy IgA; v mléce 3 formy. Laktující dojnice denně vyprodukuje asi 1,2 g IgA (Mach a Pahud, 1971). IgG1 je v kolostru a prekolostrálním sekretu zastoupen asi z 80 % z celkového množství proteinů (Park a Haenlein, 2006). Hlavním imunoglobulinem v humánním mléce je IgA, v bovinním IgG (Hurley a Theil, 2011).

Během zánětlivých procesů se zvyšuje hladina haptoglobinu, sérového amyloidu A, ceruloplasminu, alfa1-antichymotrypsinu, alfa2-makroglobulinu, fetuinu, nebo séromukoidu, zatímco u jiných živočichů je detekována vyšší hladina C-kreativního proteinu (Toman et al., 2000).

Jednou ze specifíků je také vysoká hladina konglutininu. Nízká hladina konglutininu předchází onemocněním. Konglutinin zapříčiňuje také pomalejší kinetiku alternativní dráhy komplementu (Toman et al., 2000).

3.2.1 Obranné mechanismy mléčné žlázy

3.2.1.1 Specifická imunita (získaná, adaptivní)

Organismus je denně, ať už dotykem, trávením, nebo inhalací, vystavován milionům potenciálních patogenů. Jeho schopnost bránit se infekci z části závisí na adaptivní imunitě, která je vybavená pamětí. Setká-li se organismus s určitým patogenem opětovně, je schopen ho znovu eliminovat. Odpověď specifické imunity vůči patogenu je však při

prvním setkáním se s daným patogenem velmi pomalá. Je tomu tak proto, že nejprve musí dojít k aktivaci a expanzi specifických klonů B a T buněk. Efektivní odpověď ze strany specifické imunity vůči patogenu tak může trvat několik dnů. Na druhé straně, bakterie, jejíž doba zdvojení je jedna hodina, může vyprodukovat téměř 20 milionů zralých bakterií během jediného dne. Vzhledem k výše uvedenému faktu, během prvních hodin až dnů po střetu organismu s patogenem, ochrana organismu před infekcí závisí na přirozené imunitě (Alberts et al., 2002).

T lymfocyty

T lymfocyty představují efektorové buňky buněčné imunity. Pomocí rozličné exprese povrchových molekul lze rozlišit dvě majoritní frakce T lymfocytů: pomocné T lymfocyty (T_H) a cytotoxické T lymfocyty (T_c). První skupina lymfocytů disponuje schopností produkovat cytokiny, jejichž prostřednictvím ovlivňuje procesy získané i vrozené imunity. Jsou charakteristické molekulou CD4. T_c dokáží usmrtit buňky s povrchovými antigeny vypovídající o virové nebo nádorové transformaci. Tato subpopulace T lymfocytů nese molekulu CD8. Poslední subpopulací T lymfocytů jsou tzv. regulační T lymfocyty (T_{reg}). Jejich početní zastoupení mezi T lymfocyty je minoritní. Vyznačují se modulováním a tlumením aktivit ostatních buněk imunitního systému (Lüllmann-Rauch, 2012).

B lymfocyty

B lymfocyty se nejprve aktivují v primárních lymfatických orgánech, dělí se a poté se diferencují (Lüllmann-Rauch, 2012) pomocí T_H buněk, konkrétně podtypu označovaného jako T_H2 . Stimulace probíhá pomocí interleukinů IL-4, IL-5, IL-13 a IL-10 a membránové molekuly CD40L (Panczak a Otová, 2014). Pomáhají při tom i buňky prezentující antigen (Ferenčík et al., 2005). Z B buněk se tak stávají plasmatické buňky produkující protilátky a ty zajišťují humorální imunitu organismu (Lüllmann-Rauch, 2012).

3.2.1.2 Nespecifická imunita (vrozená, neadaptivní)

Odpověď vrozené imunity nesměřuje specificky ke konkrétnímu patogenu, jako tomu je u imunity specifické. Závisí na skupině proteinů a fagocytárních buňkách, které rozeznají patogen, poté rychle dochází k jejich aktivaci a následnému zničení patogenu. Zatímco specifická imunita vznikla u obratlovců před méně než 500 miliony let, přirozená imunita

se vyskytuje také u bezobratlých a rostlin. Důležitý je také fakt, že k aktivaci adaptivní imunity u obratlovců je nejprve zapotřebí odpovědi právě imunity vrozené (Alberts et al., 2002).

Nespecifická imunita může mít následující formy:

- rezistence hostitele vůči patogenu (druhová a individuální rezistence),
- anatomické bariéry,
- tkáňové baktericidy, včetně komplementu,
- mikrobiální mezidruhová konkurence,
- schopnost vyvolat zánět,
- fagocytóza.

Z čehož první čtyři formy jsou považovány za nebuněčnou ochranu. Naopak, zánět a fagocytóza, se řadí mezi buněčné formy obrany (Todar, 2012).

Bariéra strukového kanálku

Strukový kanálek představuje vůbec první obranný mechanismus mléčné žlázy před vniknutím patogenu (Paduch a Krömker, 2011). V době mezi dojeními a v době zaprahnutí je kanálek uzavřen keratinovou zátkou sloužící jako fyzická bariéra chránící před bakteriální invazí mléčné žlázy (Huxley et al., 2002). Keratin má schopnost imobilizovat většinu kmenů nezapouzdřených bakterií vyvolávající mastitidu. Navíc, některé komponenty keratinu mohou disponovat mikrobiální aktivitou směřující vůči bakteriím způsobujícím mastitidu. Avšak tato antibakteriální funkce keratinu je limitovaná (Craven a Williams, 1985).

Kůže a sliznice

Fyzickou a chemickou ochranu před infekcí zajišťuje kůže se sliznicí. Běžná fyziologická mikroflóra na povrchu těla zabraňuje pomnožení cizích druhů nežádoucích mikroorganismů. Všechny vnitřní tkáně bez výjimky obsahují baktericidní látky. Nejpozoruhodnější substancí je enzym lysozym obsažený ve slizničním hlenu, všech tělesných tkáních a sekretech. Pokud nežádoucí organismy proniknou přes tuto ochranu, tělo je dále vybaveno buňkami, které vytvoří vůči invazi nežádoucích mikroorganismů rychlou odpověď. Mezi tyto buňky patří neutrofilů a makrofágy (Todar, 2012).

Neutrofilý

Neutrofilý jsou buňky imunitního systému, které jako první působí při infekci a zánětu organismu. V průběhu obrany organismu hrají majoritní roli (Yoshio et al., 2004). Řadí se mezi fagocytární bílé krvinky, konkrétně mezi granulocyty (Savill et al., 1989). Neutrofilý mají svůj původ v pluripotentních kmenových buňkách kostní dřeně. V kostní dřeni se diferencují a jsou vyplavovány jako zralé buňky do krevního řečiště. Neutrofilý disponují baktericidními defensiny. Životnost neutrofilů je krátká, avšak jejich zastoupení mezi leukocyty je od 30 do 70 %. Plazmatická granula, formovaná z Golgiho aparátu, obsahují mnoho baktericidních a lytických enzymů, díky kterým jsou pohlcené bakterie zneškodněny. Lysozomální granula obsahují například lysozym, kationtové proteiny, proteázy, peroxidázu a laktoferin. Neutrofilý obsahují také velkou zásobu glykogenu. Po vyčerpání energie z glykolýzy mohou fungovat v anaerobním prostředí (Todar, 2012). Kromě participace neutrofilů v primární odpovědi vůči infekci, a to především fagocytózou, produkcí toxických molekul, uvolňováním enzymů a formací extracelulárních pastí, se stávají velice důležité také pro jejich funkci při koordinaci vzniku zánětu a imunitních odpovědí organismu. Tyto další funkce neutrofilů se objevují částečně skrze jejich *de novo* produkci a uvolňování široké škály cytokinů, zahrnující chemotaktické cytokiny, tzv. chemokiny (Tecchio et al., 2014).

Makrofágy

Jedná se o heterogenní populaci buněk, které lze diferencovat na makrofágy normální a zánětlivé. Normální makrofágy jsou reprezentovány histiocyty, Kupfferovými buňkami, alveolárními makrofágy, makrofágy kostní dřeně atd. Zánětlivé makrofágy pocházejí z krevních monocytů a objevují se v zánětlivých exsudátech, kde zastávají významné výkonné a regulační aktivity. Než se stane makrofág plně funkčním, je zapotřebí jeho předešlé aktivace pomocí cytokinů (Rovenský et al., 2006). Životnost makrofágů je oproti neutrofilům poměrně dlouhá, může se pohybovat v rozmezí několika měsíců až let. Po aktivaci mohou makrofágy disponovat různými specializovanými funkcemi. Hlavní funkce všech makrofágů jsou však společné. Jsou jimi především schopnost fagocytózy, neboť makrofágy jsou považovány za velmi výkonné profesionální fagocyty. Dovednost biochemického ataku, prezentace antigenu a sekrece biologicky aktivních látek jsou pak další společné funkce všech makrofágů. Makrofágy zastávají funkci tzv. akcesorních

buněk, kdy předkládají již zpracovaný antigen lymfocytům jako imunokompetentním buňkám (Trojan et al., 2003).

Dendritické buňky (DB)

DB jsou mononukleáry (Toman et al., 2000). Patří mezi bílé krvinky a formují se v kostní dřeni z pluripotentních kmenových buněk (Gordon et al., 2013). Samy o sobě nefagocytují ani neadherují (Toman et al., 2000). Dokáží reagovat na signál poškození buňky, kdy rozpoznají tzv. šokové bílkoviny, ATP, nebo některé mikrobiální struktury běžně se nacházející vně buňky. DB tak mohou stejně jako fagocyty předkládat antigen např. lymfocytům (Jílek, 2014). DB představují nejučinnější buňky pro prezentaci antigenu a přeměnu naivních T lymfocytů na efektorové buňky. Aktivace T buněk je hlavním bodem tvorby specifické imunitní odpovědi organismu (Toman et al., 2000).

Vlivem různých cytokinů a mezibuněčných interakcí se z pluripotentních kmenových buněk mohou formovat dvě různé vývojové linie (Galy et al., 1995). První linie se označuje jako lymfoidní. Vznikají z ní buňky specifické imunity - T buňky, B buňky. Z druhé, myeloidní linie, vznikají megakaryocyty a buňky vrozené imunity zahrnující makrofágy/monocyty a polymorfonukleární leukocyty. NK buňky vznikají z lymfoidní linie, ale pracují jako součást nespecifické nebo přirozené imunitní odpovědi (Nelms et al., 2007).

NK buňky

NK buňky jsou neadherentní lymfocyty s trvale toxickými granuly na cytoplazmě. Hlavní funkcí NK buněk je zničit intracelulární patogeny a nádorové buňky, zachovat březost a regulovat krvetvorbu a růst jater (Toman et al., 2000).

K jejich aktivaci dochází pomocí interleukinů IL-2, IL-12 a interferonů typu 1 (IFN- α , IFN- β). Samy NK buňky produkují cytokiny sloužící ke komunikaci s neurohumorálním systémem (Toman et al., 2000). Jsou hlavními buněčnými efektorů přirozené imunity. Fungují samy nebo synchronně s ostatními buňkami imunitního systému (Malhotra a Shanker, 2011). Dokáží rozeznat tumorové buňky a buňky infikované, atakovat je i přesto, že nemají antigenně specifické receptory (Terunuma et al., 2008).

Komplement

Komplement tvoří zhruba 40 výkonných a regulačních glykoproteinů. Na povrchu buněk nebo v krevním séru formují různé receptory. Pro svou složitost se tato soustava může označovat jako komplementový systém (Ferenčík et al., 2005).

Po dlouho dobu byl komplementový systém považován za jednoduchou lytickou kaskádu vytvořenou za účelem usmrcení bakterií atakujících hostitelský organismus (Merle et al., 2015). Za posledních několik let se s vývojem genových technologií pohled na komplement změnil (Barrington et al., 2001). Dnes je chápán jako dohlížející komplex přirozené imunity hrající klíčovou roli při udržení homeostázy, vyvolání zánětlivé reakce a obraně proti patogenům. Patogeny mohou dostat komplement do područí, regulovat jeho aktivity a uniknout tak imunitnímu systému (Merle et al., 2015). Mezi komplementové činnosti patří např. opsonizace – pokrytí cizorodých částic protilátkami. Fagocytující neutrofile a makrofágy snadno antigen rozpoznají a mohou být, při tzv. chemotaxi, přitahovány produkty komplementového systému do místa výskytu antigenů. Komplement dále může svými produkty způsobovat lýzu, aglutinaci, zánět i aktivaci žírných buněk a bazofilů (Reece, 2011).

Proteiny akutní fáze

Proteiny akutní fáze, např. ESR (erythrocyte sedimentation rate) a C-reaktivní protein, jsou běžně detekovány ze séra jako markery zánětu a zranění organismu. Jedná se o heterogenní skupinu plazmatických proteinů, jejichž hladina se v séru zvyšuje nebo snižuje jako odpověď na zánětlivý stimul, např. infekci, trauma, systematické autoimunitní onemocnění apod. (Dowton a Colten, 1988). Odpověď je přiměřená závažnosti zánětlivého stimulu a je řízena prozánětlivými cytokiny jako je IL-6, IL-1, TNF- α a IFN- γ . Tyto cytokiny pak stimulují produkci proteinů akutní fáze v játrech. Kromě jater mohou být tyto proteiny v menší míře produkovány makrofágy, endotelovými buňkami, fibroblasty a adipocyty (Gabay a Kushner, 1999).

3.3 Lymfocyty

Lymfocyty vznikají z lymfoidních kmenových buněk v lymfatických orgánech a tkáních. V těchto specializovaných tkáních se buňkám dostává vhodného mikroprostředí k jejich proliferaci, diferenciaci a k získání imunokompetence, čili dovednosti specificky reagovat s antigenem. Rozlišují se centrální a periferní lymfatické

orgány. Thymus a kostní dřev jsou centrálními orgány. Mízní uzliny, slezina a neorganizované shluky lymfatické tkáně vázané na sliznice patří do periferních lymfatických orgánů (Trojan et al., 2003). Vzniklé lymfocyty jsou základními buňkami lymfatické tkáně kulatého tvaru s velkým jádrem lemovaným cytoplazmou (Rovenský et al., 2006). Představují funkčně heterogenní skupinu imunitních buněk obratlovců (Toman et al., 2000). Na základě své funkce, povrchových znaků a ultrastruktury se dělí do tří hlavních populací na B lymfocyty, T lymfocyty a NK buňky (Rovenský et al., 2006). Prekurzory B i T lymfocytů se vyvíjejí v kostní dřev. Prekurzory B lymfocytů svůj vývoj dále prodělávají u ptáků ve Fabriciově burse. Získali proto označení B (Panczak a Otová, 2014). U dospělých savců B lymfocyty dozrávají v morfoloicky nepřesně vymezených kompartmentech kostní dřevě (Lüllmann-Rauch, 2012). T lymfocyty zase v thymu, proto se značí písmenem T (Panczak a Otová, 2014).

3.3.1 Receptory lymfocytů

Transmembránové proteiny, nacházející se na povrchu buněk, zvané receptory, zajišťují specifickou vazbu antigenů. Dochází tak k dalším buněčným pochodům (Lüllmann-Rauch, 2012). Receptory jsou ve spojení s aktivačním systémem, např. s proteinkinázami. Skrze tzv. sekundární posly, které tvoří cytoplazmatické molekuly, aktivují transkripční faktory. Dochází k přepisu genů (Toman et al., 2000). Místo sousedící s receptorem se nazývá koreceptor. Koreceptory lymfocytů reagují s molekulami na povrchu sousedních buněk, což vede k aktivaci lymfocytu (Lüllmann-Rauch, 2012).

Buňky mají na svém povrchu různý počet receptorů. Receptory slouží k předání signálu. Ve většině případů se jedná o pozitivní signály zvané také aktivační. Na tyto signály sama buňka reaguje specifickou činností nebo může vyslat vlastní signál jiné buňce (Ferenčík et al., 2005).

Monoklonální protilátky CD (cluster of differentiation) antigenů se používají k popisu membránových proteinů leukocytů. CD antigeny jsou očíslovány. Čísla jsou řazena časovou posloupností jejich popisu (Toman et al., 2000). Jedním z důležitých antigenů u lymfocytů je CD44. Exprimují ho aktivované paměťové a efektorové lymfocyty (Nouza, 1999).

3.3.1.1 Antigen CD44

CD44 je všudypřítomná multistrukturní a multifunkční molekula sloužící k adhezi lymfocytů v interakcích buňka-buňka a buňka-matrix, k prezentaci chemokinů a růstových faktorů, k přenosu růstových signálů atd. Tento povrchový glykoprotein může mít několik forem a označení. Např. nejmenší molekuly CD44 jsou standardní antigeny CD44, označované jako CD44s. Produkují je převážně lymfo-hematopoetické buňky. Můžou být proto označovány také jako CD44H (Naor et al., 1997). Detekován byl zatím pouze u vyšších živočichů (Goodison et al., 1999). Primárně se váže na kyselinu hyaluronovou. Dále se může vázat na kolagen, laminin, chondroitin sulfát atd. CD44 participuje při absorpci a intracelulární degradaci kyseliny hyaluronové, stejně jako při přenosu signálů zprostředkovávající hematopoézu a apoptózu. Velké množství antigenu CD44 je produkováno mnoha rakovinnými buňkami a jejich metastázemi. CD44 lze využít jako diagnostický či prognostický marker některých humánních zhoubných onemocnění (Naor et al., 1997).

Jeho hlavní fyziologická úloha je udržovat orgánovou a tkáňovou strukturu skrze buňka-buňka a buňka-matrix adhezi. Avšak určité variantní izoformy mohou také zprostředkovávat aktivaci lymfocytů, prezentaci chemických faktorů a hormonů a „homing“ (Goodison et al., 1999), čili návrat lymfocytů do té periferní tkáně během recirkulace, kterou již jednou prošly (Trojan et al., 2003). Receptor CD44 se nenachází pouze na lymfocytech. Vycestování monocytů a neutrofilů z krevního řečiště do místa zánětu je rovněž závislý na CD44 (Alstergren et al., 2004). CD44 výkonně zprostředkovává rozpoznání a fagocytózu neutrofilů (Hart et al., 1997) a také je kompetentní receptor pro fagocytózu makrofágy (Vachon et al., 2006).

CD44 se nachází na spoustě tkání zahrnující centrální nervový systém, plíce, pokožku, játra, slinivku břišní. Známou funkcí CD44 je buněčná adheze (agregace a migrace), degradace kyseliny hyaluronové, aktivace lymfocytů, myelopoéza a lymfopoéza, angiogeneze a produkce cytokinů. Funkce CD44 jsou závislé na buněčné adhezi (Sneath a Mangham, 1998).

3.4 Mastitidy

3.4.1 Zánět

Zánět je obranný mechanismus, kdy organismus reaguje vůči poškození vlastních buněk a tkání. Faktory vyvolávající poškození se dělí na:

- mechanické – např. odřeniny,
- fyzikální – např. popálení,
- chemické – např. poleptání žíravinou,
- biologické – např. invaze bakterií
- a nutriční problémy – např. hypoxie (Ferenčík et al., 2005).

Zánětlivá odpověď organismu se zakládá na buněčné a humorální složce imunity s cílem dosáhnout stavu organismu, jaký byl před poškozením (Serhan et al., 2010). Zánětlivá reakce vyžaduje účast buněk imunitního systému. Především neutrofilů, makrofágů, T lymfocytů, endotelových buněk cév, eozinofilů, žírných buněk, trombocytů. Zasahují rovněž mnohoenzymové systémy krevní plazmy a další výkonné a regulační molekuly. Probíhající zánět je v organismu usměrňován pomocí zánětových mediátorů. Jedná se o různé cytokiny, chemokiny, prostaglandiny, proteiny akutní fáze aj. (Ferenčík et al., 2005). Zánětlivá reakce zahrnuje fagocytózu pomocí makrofágů, vazodilataci a zvýšení propustnosti kapilár a přesun bílých krvinek do místa zánětu (Kittnar et al., 2011). Organismus může na zánět reagovat *lokálně* nebo *celkově*. U lokálního projevu jsou patrné otoky, bolestivost, zčervenání apod. Celkový zánět se projevuje horečkou. V některých případech dochází až ke zhroucení organismu a smrti (Ferenčík et al, 2005).

Akutní zánět

Objevuje se během několika málo hodin po zranění. Při akutní zánětlivé odpovědi probíhá komplex dějů zahrnující prosakování vody, solí a proteinů z vaskulárního kompartmentu. Organismus se snaží vyrovnat se se zraněním. Aktivuje endotelové buňky, probíhá adhezivní interakce mezi leukocyty a vaskulárním endotelem. Běžný je také příliv leukocytů, aktivace tkáňových makrofágů, aktivace krevních destiček a jejich agregátů, aktivace komplementu, srážení a fibrinolytické systémy a uvolňování proteáz a oxidantů z fagocytujících buněk. Aktivované endotelové buňky často produkují na povrch svého lumen tkáňové faktory (TF, faktor III). TF je silný prokoagulant (Serhan et al., 2010).

Ať už se jedná o fyzický či chemický faktor, infekční organismy, nebo o jiné důvody vedoucí k poškození tkáně, primárním, charakteristickým znakem akutního zánětu je adheze neutrofilů (polymorfonukleárních leukocytů, PMN) na cévní endotel (Serhan et al., 2010). Neutrofilové regulují vývoj akutního zánětu. Jsou prvními buňkami, které přicestují do místa vzniku akutního zánětu (Ferenčík et al., 2005).

Chronický zánět

Akutní zánět je ukončený odstraněním leukocytů buď skrze lymfatický systém, nebo apoptózou (Serhan et al., 2010). Není-li původce akutního zánětu eliminován, nastává dlouhodobý proces, chronický zánět (Kontseková a Kontsek, 2004). Tento typ zánětu je řízen především pomocí makrofágů a T lymfocytů (Ferenčík et al., 2005). Není definován délkou svého trvání. Zprvu je vyvolán cévní odpovědí zahrnující adhezi molekul na povrchu endotelových buněk, především adhezi lymfocytů a monocytů. Následuje jejich přesun do extravaskulárního kompartmentu. Co se lymfocytů týče, většinu z nich tvoří T lymfocyty. Rovněž při akutním zánětu, lymfocyty a monocyty, stejně jako endotelové buňky, podstupují aktivační proces (Serhan et al., 2010).

3.4.2 Bovinní mastitidy

Mastitida je zánět mléčné žlázy způsobený vniknutím a zmnožením patogenních organismů uvnitř žlázy (Harmon, 1994). Na jejím vzniku a vývoji participuje více faktorů. Označuje se proto jako polyfaktoriální onemocnění. Významnou roli při jejím vzniku hraje genetická dispozice, vysoká užitkovost, úroveň výživy, technologie ustájení a dojení, hygiena mléčné žlázy apod. (Lamka a Ducháček, 2014). Při samotné mastitidě jde o sled událostí vedoucí k poklesu dojivosti, změnám složek mléka a zvýšení obsahu somatických buněk jako odpovědi organismu vůči invazi na mléčnou žlázu. Tato odpověď je řízena zánětlivými mediátory. Počet somatických buněk je ovlivněn především vážností infekce (Harmon, 1994). Mastitida se považuje za jedno z nejdražších onemocnění u dojeného skotu právě kvůli již zmíněnému poklesu dojivosti (DeGraves a Fetrow, 1993).

Klinická mastitida

Zánět je viditelný. Může se objevit zarudnutí, zvýšená teplota, otok vemene. Dochází k poklesu nádoje a změně charakteru mléka (Lamka a Ducháček, 2014). Tato forma

mastitidy se začíná stávat v chovech dojeného skotu značným problémem (Barkema et al., 1998).

Subklinická mastitida

Subklinická mastitida je nejčastější formou zánětu mléčné žlázy. Zánět nelze vizuálně detekovat. Příznačné je zvýšení počtu somatických buněk v mléce a invaze bakteriálních patogenů ve vemeni (Lamka a Ducháček, 2014).

3.4.3 Původci mastitid

Mastitidu mohou vyvolávat neinfekční vlivy, jako jsou mechanické, fyzikální, chemické vlivy, nebo trauma. V chovech dojnic je nejvíce zastoupena infekční mastitida. Je ovlivněna makroorganismem dojnice, infekčním činitelem a vnějším prostředím. Infekční činitel ovlivňuje vznik a průběh mastitidy nejen svou početností, ale také patogenitou, virulencí a antigenicitou (Slanina et al., 1991). Schopnost bakterií invadovat může být hodnocena *in vitro* měřením jejich způsobilostí napadnout izolované buňky z epitelu mléčné žlázy (Anaya-Lopez et al., 2006).

Rod bakterií *Staphylococcus*

Bakterie rodu *Staphylococcus* produkují velké množství substancí schopných vyvolat chorobný stav. Tyto virulentní substance jsou bakteriemi vylučované toxiny a také povrchové proteiny, které mohou hrát v patogenezi více rolí. Avšak nemusí být přímo toxické k hostitelské tkáni. I přes jejich schopnost vyvolat onemocnění u lidí a zvířat, nejsou nezbytně patogenními organismy. Jejich virulence není primárně určena k vyvolání onemocnění u hostitele. Pravý účel této jejich schopnosti spočívá ve zvýšení jejich životaschopnosti v nepříznivých podmínkách prostředí. Důležitý je také fakt, že u žádného z jednotlivých faktorů produkovaných bakteriemi tohoto rodu nebyla prokázána ani jeho nezbytnost, ani dostatečnost způsobit infekci. Tento fakt byl prokázán nesčetněkrát, kdy v různých pokusech byly použity kmeny bakterií, které dokázaly vyvolat onemocnění i v případech, kdy již ztratili schopnost produkce specifických toxinů (Honeyman et al., 2006).

Rod bakterií *Streptococcus*

Některé druhy bakterií rodu *Streptococcus* jsou primárně patogenní. Existují však také druhy nepatogenní a podmíněně patogenní (Maďar et al., 2006). Celý rod bakterií je

rozdělen do tří skupin na základě hemolýzy na krevním agaru. Beta hemolýza je specifická úplným rozpadem červených krvinek (Patterson, 1996). Bakterie beta hemolýzy jsou později toxické také vůči bílým krvinkách (Vasanthakumari, 2007). U alfa hemolýzy dochází k neúplnému rozpadu a při gama hemolýze naopak k žádnému rozpadu krvinek nedochází. Beta hemolytické bakterie rodu *Streptococcus* se dělí dle výskytu skupinově specifického polysacharidu C (Patterson, 1996). Tento antigen obsažený v buněčné stěně bakterií je specifický pro každou skupinu zvlášť. Rozlišuje se 20 skupin označených A až Z dle Lancefieldové (Vasanthakumari, 1996).

Koliformní bakterie

Tyto bakterie obvykle nejsou patogenní. Ve většině případů jsou však přítomny tam, kde patogeny. Koliformní bakterie jsou rozšířeny oproti patogenům hojněji a mnohdy zůstávají po dlouhou dobu životaschopné ve vodním prostředí (Chin, 2012). Je pro ně typická aktivita beta galaktosidázy (Gleeson a Gray, 2002). Nejznámější zástupce těchto bakterií, *E. coli*, vykazuje ještě navíc aktivitu beta glukuronidázy (Easter, 2003).

3.5 Bakterie jako původci mastitid

I přes všeobecnou variabilitu ve složení a struktuře mikrobiální buněčné stěny, exoskeletonová struktura je společná téměř všem. Chybí pouze několika málo skupinám. U bakterií se ve většině případů nazývá peptidoglykan. Může se také označovat jako murein, méně často jako mukopeptid, glykopeptid nebo bazální struktura. Podle druhu bakterie představuje peptidoglykan 5 až 90 % obsahu buněčné stěny. Podle složení bakteriální stěny se bakterie dělí na Gram-pozitivní a Gram-negativní bakterie. Gram-negativní bakterie obsahují méně peptidoglykanu. U Gram-pozitivních je to až mezi 40 a 60 % (Seltmann a Holst, 2013).

3.5.1 Gram-pozitivní bakterie

Peptidoglykanové vrstvy Gram-pozitivních bakterií jsou výrazně tenčí oproti vrstvám Gram-negativních bakterií. Jejich neporušená stěna může čelit tlaku až 50 atmosfér, zatímco stěna Gram-negativních bakterií, ačkoliv je v porovnání se stěnou Gram-pozitivních bakterií silnější, dokáže odolávat tlaku pouze 5 atmosfér. Kromě peptidoglykanu, buněčné stěny Gram-pozitivních bakterií obsahují především proteiny a polysacharidy. Obsah lipidů je nízký. Postrádají vnější membránu. Lipoteichoová

kyselina není součástí buněčné stěny, ale cytoplazmatické membrány (Seltmann et al., 2013).

Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus je fakultativně anaerobní kokovitá bakterie náležící do čeledi *Streptococcaceae* (Honeyman et al., 2006). Produkuje širokou škálu exoproteinů. Jejich prostřednictvím kolonizuje svého hostitele a vyvolává onemocnění. Téměř všechny kmeny produkují enzymy a cytotoxiny, které obsahují čtyři druhy hemolýzy (alfa, beta, gama a delta), nucleázy proteázy, lipázy, hyaluronidázy a kolagenázy. Primární funkcí těchto proteinů je konvertovat lokální tkáň hostitele na živiny nezbytné pro bakteriální růst. Některé kmeny produkují exoproteiny jako je toxin syndromu toxického šoku (TSST-1), stafylokokové enterotoxiny, exfoliatinové toxiny a leukocidin. Tyto toxiny jsou všechny známy pro svůj možný vliv na buňky imunitního systému. Primárně se snaží inhibovat imunitní odpověď hostitelského organismu vůči napadení bakterií *Staphylococcus aureus*. Většina z nich má i jiné biologické vlivy (Dinges et al., 2000).

Streptococcus agalactiae

Streptococcus agalactiae je fakultativně anaerobní kokovitá bakterie z čeledi *Streptococcaceae* (Elder et al., 2004). Způsobuje infekční onemocnění především u novorozenců (Sims a Barton, 2006). Tato bakterie produkuje pyrogenní toxiny způsobující v hostitelském organismu syndrom toxického šoku (Akharass et al., 2013). Dále produkuje slabou beta-hemolýzu (Engelkirk a Duben-Engelkirk, 2008) a spoustu enzymů, což pravděpodobně způsobuje destrukci mléčné žlázy (Markey et al., 2013).

Streptococcus uberis

Jedná se o fakultativně anaerobní kokovitou bakterii z čeledi *Streptococcaceae* (Blowey a Edmondson, 2010). Produkuje exoenzymy zahrnující také aktivátor plazminogenu, který přeměňuje plazminogen na plazmin. Plazmin představuje proteázu, která dokáže hydrolyzovat kasein na peptidy, které použije ke svému růstu. Díky pouzdru bakterie dochází k rezistenci vůči fagocytóze (Markey et al., 2013).

3.5.2 Gram-negativní bakterie

Stěna Gram-negativních bakterií je komplexnější v porovnání se stěnou Gram-pozitivních bakterií. Avšak peptidoglykan zde tvoří 10 a méně procent z celkového

obsahu buněčné stěny. V místě výskytu teichoové kyseliny je peptidoglykan navázán lipoproteiny. Další vrstvy lipopolysacharidů, fosfolipidů a proteinů jsou obsaženy mimo peptidoglykan. Tato vícevrstvá struktura představuje plášť stěny Gram-negativních bakterií (Srivastava, 2013).

Escherichia coli

Escherichia coli je fakultativně anaerobní nesporulující tyčinkovitá bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae* (Lawrence, 2005). Může produkovat tepelně labilní (heat-labile, LT) enterotoxin, který se molekulární velikostí, sekvencí, antigenicitou, funkcí a enzymatickou aktivitou shoduje s toxinem cholery (Ctx). Tepelně stabilní toxin (heat-stable, ST) *E. coli* dokáže vzdorovat varu až 30 min. V hostitelském organismu způsobuje sekreci tekutin a elektrolytů vedoucí k průjmům (Todar, 2012). Po lýze bakterie dochází k uvolnění endotoxinu z buněčné stěny. Náhlé vylití do organismu může způsobit závažnou toxémii (Markey et al., 2013).

3.6 Apoptóza

Apoptóza, programovaná buněčná smrt, představuje aktivní formu zániku buněk. Jde o fyziologický děj vedoucí ke tkáňové homeostáze (Cibula et al., 2009). Programy buněčné aktivity řídí celý mechanismus. Buňky mohou zanikat také patologickým procesem, pomocí nekrózy. Nekróza způsobuje narušení iontové intracelulární homeostázy (Kittnar et al., 2011). Zatímco během apoptózy se postupně vytrácí mezibuněčné kontakty, dochází ke změnám buněčného jádra, cytoplazmatická membrána měchýřkovatí (Cibula et al., 2009). Buňka se rozpadne na jednotlivá, membránou izolovaná, apoptotická tělíčka určená k fagocytóze. Enzymy buňky se tak nedostanou mezi okolní buňky a neprobíhá žádná zánětlivá reakce v místě apoptotického procesu (Kittnar et al., 2011). Celý proces apoptózy začíná induktivním signálem nebo ztrátou supresivního signálu. Membránový protein Fas nebo cytokin TNF- α se naváže na membránový receptor TNFR1, což způsobí aktivaci kaspáz (Toman et al., 2000). Kaspázami se rozumí výkonné apoptotické proteolytické enzymy. Doba jejich aktivace se označuje jako exekutivní fáze. Z biochemického hlediska existují dva hlavní směry apoptózy, které předcházejí exekutivní fázi. První, vnější (extrinzická) cesta vede k buněčné destrukci pomocí efektorových buněk imunitního systému. Těmito buňkami jsou cytotoxické T lymfocyty a NK buňky, které na svůj povrch exprimují membránově vázané ligandy (death ligands). Receptory smrti náleží do skupiny receptorů pro tumor nekrotizující faktor (TNFR).

Druhá cesta, vnitřní (intrinzická), je typická vznikem apoptotických aktivačních komplexů na povrchu zevní membrány mitochondrií. Na tomto vzniku se podílí proteiny rodiny Bcl-2. Obě cesty se slučují do společné exekutivní fáze (Cibula et al., 2009).

Apoptózu řídí geny spouštěné pomocí signálů vně, nebo uvnitř buňky. Enzymy uvnitř buňky se začnou aktivovat, popřípadě se mohou také generovat nové enzymy potřebné k fragmentaci jaderné DNA a reakci cytoskeletu (Kittnar et al., 2011). Apoptotické buňky produkují na svůj povrch látky jako je adenosintrifosfát, uridintrifosfát, fraklakin apod. za účelem vytvořit signál a nalákat fagocyty. Tyto signály se označují jako *find-me signals*. Fagocytující buňky využijí svých receptorů, aby zachytili další signál apoptotické buňky, *eat-me signals*, vysílaný pomocí fosfatidylserinu. Jakmile receptory fagocytů zachytí fosfatidylserin, dojde k produkci protizánětlivých cytokinů jako je TGF- β , IL-10 a prostaglandin E2 (Ravichandran, 2010).

3.6.1 Apoptóza lymfocytů

Po mitotickém množení v mikroprostředí centrálních mízních orgánů lymfocyty putují do periferních mízních orgánů. V této fázi jsou lymfocyty schopny reagovat na specifický imunokompetentní antigen. Jsou označovány jako lymfocyty naivní, jelikož u nich zatím nedošlo ke konfrontaci s antigenem. Diferenciace a zrání je plně dokončena jen u velmi malé části lymfocytů. Okolo 95 % jich zaniká apoptózou (Lüllmann-Rauch, 2012).

Bakteriální infekce hraje důležitou roli pro vyvolání apoptózy lymfocytů. Dokáže ji vyvolat velká spousta patogenních bakterií (Lancellotti et al., 2006). Může se jednat jak o Gram-pozitivní, tak Gram-negativní patogenní bakterie. Mezi stěžejní představitele Gram-pozitivních bakterií způsobující apoptózu lymfocytů patří především *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* a další. *E. coli*, *Borrelia burgdorferi*, *Mannheimia haemolytica* a *Yersinia pseudotuberculosis* náleží mezi hlavní zástupce Gram-negativních bakterií vyvolávající apoptózu lymfocytů (Carrero a Unanue, 2006).

Všechny bakteriální patogeny produkují lipoproteiny (Aliprantis et al., 1999), proteiny syntetizující inhibitory, pórůtvorné proteiny, molekuly odpovědné za aktivaci vnitřních pochodů způsobující smrt infikovaných buněk a superantigeny (Lancellotti et al., 2006), které ústí v odpověď přirozené imunity organismu. Tyto lipoproteiny způsobují apoptózu monocytů (Aliprantis et al., 2006). Superantigenem může být například stafylokokový

enterotoxin C secernovaný bovinním kmenem *Staphylococcus aureus* během infekce mléčné žlázy (Kenny et al., 1993). Zánětlivá odpověď organismu vyvolaná bakterií *Staphylococcus aureus* nebo *Streptococcus uberis* spěje k postupnému zvýšení apoptotických lymfocytů (Sláma et al., 2009a). Interakce stafylokokových superantigenů s T buňkami vedou k jejich aktivaci (Webb a Gascoigne, 1994) a apoptóze (Damle et al., 1993). *Staphylococcus aureus* dále secernuje např. enterotoxin B (Goodyear a Silverman, 2003) a α -toxin způsobující apoptózu T buněk *in vitro* skrze vnitřní cestu vedoucí k apoptóze (Jonas et al., 1994). Avšak role apoptózy T buněk při odpovědi organismu vůči infekci způsobené bakterií *Staphylococcus aureus* není zcela jasná (Carrero a Unanue, 2006). Enterotoxin B způsobuje buněčnou smrt T buněk pomocí vazby na receptory T buněk (Sabapathy et al., 1994). Vazba na receptor antigenu u B buněk způsobuje rozpad mitochondriální membrány a aktivuje kaspázy (Goodyear a Silverman, 2003).

Listeria monocytogenes indukuje apoptózu lýzou fagozomální membrány a vniknutím do cytosolu, kde vyvolá infekci toxinem, listeriolysinem O (LlyO), který sama produkuje (Merrick et al., 1997). Apoptóza lymfocytů způsobená tímto toxinem probíhá cestou závislou i nezávislou na kaspáze. LlyO způsobuje apoptózu lymfocytů spojenou s aktivací kaspázy-9 a kaspázy-3 a se ztrátou membránového potenciálu (Carrero et al., 2004).

Muramyl dipeptid (MDP) je nejmenší strukturní jednotka peptidoglykanů u Gram-pozitivních bakterií. Po aplikaci do mléčné žlázy dochází k zánětlivé odpovědi organismu (Duarte et al., 1997). Při jeho *in vitro* inkubaci s bovinními oddaluje jejich apoptózu. Čili MDP reguluje apoptózu bovinních lymfocytů (Sláma et al., 2009a). *E. coli*, stejně jako jiné Gram-negativní bakterie, produkuje ze své buněčné stěny toxin lipopolysacharid (LPS). Intramamární aplikace LPS z *E. coli* vyvolává zánět mléčné žlázy stejně jako aplikace MDP. LPS ovlivňuje životnost neutrofilů v mléčné žláze (Langrová et al., 2008). V podmínkách *in vitro* LPS oddaluje apoptózu bovinních lymfocytů (Sláma et al., 2009b).

Borrelia burgdorferi způsobuje smrt humánních lymfocytů (Dorward et al., 1997). Apoptóza lymfocytů způsobená *Borrelia burgdorferi* je doprovázená nadměrnou expresí CD95. Je-li Fas receptor blokován anti-CD95, pak dochází k poklesu apoptózy (Perticarari et al., 2003).

Mannheimia haemolytica produkuje RTX proteiny (repeat-in toxin) vyvolávající apoptózu buněk již při nízké koncentraci (Tatum et al., 1998). Při vysokých koncentracích má RTX cytolytický vliv na bovinní lymfocyty (Stevens a Czuprynski, 1996).

3.7 Cytokiny

Cytokiny představují celistvý komplex signálních proteinů mezi různými buňkami, které jsou esenciální pro rozvoj a regulaci procesů přirozené a získané imunity (Feldmann, 2008). Tyto molekuly, dříve nazývány interleukiny, interferony, růstové faktory a faktory způsobující nekrózu nádorů (TNF), jsou intenzivně studovány posledních 30 let (Vilcek a Feldmann, 2004). Představují velkou skupinu zahrnující více než 100 malých proteinů, které jsou produkovány jak imunitními tak neimunitními buňkami a které působí lokálně mezi sousedícími buňkami, aby řídili důležité biologické procesy jako je zánět, imunita, náprava a novotvorba krevních kapilár (angiogeneze) (Feldmann, 2008).

Jelikož cytokiny a jejich receptory předávají klíčové signály k důležitým biologickým procesům v organismu, jakákoliv abnormalita u cytokinů, jejich receptorů, nebo odchylka v signalizačním procesu vytváří široký prostor pro různé varianty onemocnění. Anticytokinová léčba je rychle se rozvíjející obor s výrazným farmaceutickým dopadem (Feldmann, 2008). Principem této léčby je geneticky vytvořený protein zaměřený proti konkrétnímu cytokinu (Martínková et al., 2005).

Cytokiny mají diverzní a pleiotropní účinky, jelikož jeden cytokin může působit při imunologických, hematopoetických i pro-zánětlivých aktivitách (Bukowski et al., 1994).

3.7.1 Rozdělení cytokinů

Cytokiny lze dělit podle více kritérií. Ať už podle historického vývoje, jak byly postupně objevovány, jejich struktury nebo funkce. Funkční rozdělení cytokinů je následující:

- Prozánětlivé cytokiny: IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, TNF, IFN- γ .
- Protizánětlivé cytokiny: IL-1 Ra, IL-4, IL-10, TGF- β .
- Růstové faktory hemopoetických buněk: IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-7, IL-9, IL-11, IL-14, IL-15, C-CSF, M-CSF, GM-CSF, SCF, LIF, EPO.
- Cytokiny protilátkové imunity: IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13.
- Cytokiny buněčně zprostředkované imunity: IL-2, IL-12, IFN- α , GM-CSF, LT.
- Cytokiny antivirového účinku: IFN- α , IFN- β , IFN- γ (Koudelková et al., 2010).

3.7.1.1 Prozánětlivé cytokiny

Prozánětlivé cytokiny způsobují propuknutí a následnou stimulaci zánětlivé odpovědi organismu (Živná a Živný, 2004). Jsou účastny na zánětlivé reakci (Zhang a An, 2007). Stav nemocného organismu zhoršují (Dinarello, 2000). Secernují se od počátku zánětu širokým spektrem buněk (Živná a Živný, 2004), převážně aktivovanými makrofágy (Zhang a An, 2007). V místě zánětu stimulují antigen prezentující buňky (APC) a endotelie k expresi adhezních molekul. Dochází k aktivaci, diferenciaci a proliferaci zánětlivých buněk (Živná a Živný, 2004). V době zánětu vstupují do krevního řečiště a v játrech vyvolávají syntézu proteinů akutní fáze (Toman et al., 2000). Vyvolávají horečku (Živná a Živný, 2004). Některé prozánětlivé cytokiny (IL-1 β , IL-6 a TNF- α) způsobují stav patologické bolesti (Zhang a An, 2007).

Tumor nekrotizující faktor (TNF- α)

TNF- α je klíčový cytokin v patogenezi mnoha chronických zánětlivých onemocnění. Jeho zvýšená hladina je typická např. pro Crohnovu nemoc, svrab, revmatoidní artritidu. Ačkoliv TNF- α je nepostradatelný pro aktivaci vrozené a získané imunitní odpovědi, doba trvání imunitní odpovědi a nepřiměřená produkce tohoto cytokinu může vyvolat patologické změny ústící právě z chronického zánětu a poškození tkáně. Řadí se mezi primární cytokiny, čili je součástí přirozené imunity a může nezávisle vyvolat kaskády zánětů v tkáních. Sekundární cytokiny jsou v kaskádě produkovány později a rozsah jejich aktivit je oproti primárním cytokinům limitovaný. TNF- α dále ovlivňuje buněčný metabolismus, antivirové aktivity, koagulační procesy, regulaci růstu buněk a insulinovou odpověď (Weinberg a Buchholz, 2006).

3.7.1.2 Protizánětlivé cytokiny

Skupina těchto cytokinů je souborem imunoregulačních molekul kontrolujících odpověď prozánětlivých cytokinů (Opal a DePalo, 2000). Jejich snahou je redukovat zánět a podpořit léčbu organismu (Dinarello, 2000). Spolupracují se specifickými cytokinovými inhibitory a rozpustnými cytokinovými receptory na regulaci imunitní odpovědi. Jejich fyziologická role při zánětu a patologická role při systémovém zánětu je stále více studována (Opal a DePalo, 2000).

Interleukin 4 (IL-4)

IL-4 usměrňuje řadu biologických funkcí v organismu. Řídí například růst, diferenciaci a apoptózu několika typů buněk hematopoetického a nehematopoetického původu.

Důležitá je jeho úloha při běžné imunitní odpovědi, kdy IL-4 reguluje Th0 buněčnou diferenciaci. Rovněž participuje při přímé odpovědi Th2 buněk vůči parazitické infekci (Zamorano et al., 2003). Významný je při rozvoji alergického zánětu (Steinke a Borish, 2001). Produkují ho především žírné buňky, Th2 buňky, eosinofily a bazofily. Tento interleukin je velmi rozsáhle studován v souvislosti s imunitním systémem. Avšak současné poznatky vedou k přesvědčení, že IL-4 zastává důležitou roli také v mozku, a to při procesech učení a paměti (Gadani et al., 2012).

Interleukin 10 (IL-10)

IL-10 spadá do cytokinové rodiny celkem šesti imunitních mediátorů, kterými jsou IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 a IL-26. Tato cytokinová rodina, nazvaná IL-10 cytokinová rodina, vznikla na základě podobnosti ve struktuře a umístění kódujících genů jednotlivých cytokinů, jejich primární a sekundární bílkovinné struktury a také komplexů receptorů, které jednotlivé cytokiny používají (Sabat, 2010). IL-10 je společně s TGF- β a IL-35 nejdůležitější protizánětlivý cytokin. Produkují ho aktivované makrofágy a T buňky (Sabat et al., 2010). Může však být produkován různými druhy myeloidních i lymfoidních buněk (Couper et al., 2008). Působí skrze transmembránový receptorový komplex a reguluje tím funkce ostatních imunitních buněk. Oslabuje produkci zánětlivých mediátorů a inhibuje antigenovou prezentaci (Sabat et al., 2010).

Transformující růstový faktor (TGF- β 1)

TGF- β 1 dozírá na diferenciaci, proliferaci i aktivaci velké spousty buněk (Peralta-Zaragoza et al., 2001) a na expresi mnoha genů (Ohba et al., 1994). Obecně je činný ve více oblastech imunitní odpovědi během vzniku infekčního onemocnění a rakoviny. Produkují ho lymfocyty, makrofágy a dendritické buňky (Peralta-Zaragoza et al., 2001). Slouží ke snížení produkce zánětlivých cytokinů (Fadok et al., 1998). Jedná se o takový cytokin, který *in vitro* působí především na hematopoetické kmeny buněk a vývoj lymfocytů. *In vivo* je TGF- β 1 stěžejním regulátorem pro homeostázu hematopoetického kmenu buněk, a to díky schopnosti migrace buněk do místa jejich usídlení (homing) (Capron et al., 2010).

3.7.2 Cytokiny produkované lymfocyty

Cytokiny produkované lymfocyty se nazývají lymfokiny. Působí-li tyto látky na jiné typy bílých krvinek, používá se pro ně název interleukiny (Kozák, 2015). Jedná se především o následující cytokiny.

Interleukin 2 (IL-2)

IL-2 má široké spektrum funkcí v imunitním systému. Majoritní úlohou je regulace imunitní aktivity a homeostázy. U buněk typu CD4⁺ indukuje expanzi antigen-specifických klonů skrze proliferaci a anti-apoptický mechanismus. Zvětšuje produkce ostatních cytokinů. Je nezbytný pro vznik subtypů Th1 a Th2 lymfocytů. Pro buňky CD8⁺ je důležitý ve zvětšení sekrece cytokinů a pro proliferaci paměti CD8⁺ buněk. B-lymfocytům koriguje sekreci protilátek a zajišťuje proliferaci, stejně jako NK buňkám (Gaffen a Liu, 2004).

Interferon alfa (IFN- α)

IFN- α aktivuje NK buňky a zvyšuje jejich cytotoxickou aktivitu (Jewett a Bonavida, 1995). Již řadu let je známý jako antivirové a protinádorové léčivo. Regulací různých cytokinů a jejich receptorů je IFN- α schopen vyvolat imunitní odpověď a poskytnout efektivní protinádorovou a protivirovou imunitní odpověď. Stimuluje vrozenou buněčnou imunitní odpověď a poté participuje na jejím převodu z počáteční vrozené imunitní odpovědi na efektivní adaptivní imunitní odpověď (Brassard, 2002).

Interferon gama (IFN- γ)

IFN- γ koordinuje různorodé seskupení buněčných programů skrze transkripční regulace imunologicky relevantních genů (Schroder et al., 2004). Dokáže posílit vrozenou imunitu indukci antimikrobiálních faktorů nebo degradačních drah v ostatních imunitních buňkách (např. v makrofázích). Přímo inhibuje replikaci virů a aktivuje imunitní odpověď k jejich eliminaci. Chrání tak organismus před viry způsobenou patogenitou a případnou smrtí (Bao et al., 2014).

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Pokusná zvířata a design experimentu

Experimenty byly provedeny na 8 klinicky zdravých jalovicích. Jednalo se o kříženky holštýnského a českého strakatého plemene ve věku okolo 18 měsíců. Ustájení bylo realizováno v certifikované pokusné stáji. Všem jalovicím byla zkrmována stejná standardní krmná dávka po celou dobu experimentu. Mléčné žlázy jalovic byly před každým dílčím experimentem bakteriologicky vyšetřeny.

Zánětlivá odpověď mléčné žlázy byla vyvolána pomocí muramyl dipeptidu (MDP) a lipopolysacharidu (LPS). Jednalo se o syntetický derivát MDP (MurNAc-L-Abu-D-IsoGln, Institut Organické chemie a biochemie České akademie věd, Praha, Česká republika), použitá koncentrace 500 μg ve 20 ml PBS (fyziologický roztok, phosphate buffered saline, 0,01 M, pH 7,4, Sigma, Saint Louis, Missouri, USA) na jednu mléčnou žlázu a LPS *E. coli*, serotyp 0128:B12 (Sigma, Missouri, USA) o koncentraci 5 μg ve 20 ml PBS na jednu mléčnou žlázu. Jako kontrola byl použit PBS, a to opět 20 ml na jednu mléčnou žlázu.

Všechny mléčné žlázy byly před vypláchnutím dezinfikovány 70% ethanolem. Desinfekce byla zaměřena především na okolí zevního ústí strukového kanálku. Následně byla provedena laváž pomocí upravených uretrálních katetrů (AC5306CH06, Porges S. A., Francie). Po vyvolání zánětlivé odpovědi byly mléčné žlázy vypláchnuty podle následujícího schématu: pravá přední – 24 hodin, pravá zadní – 48 hodin, levá přední – 72 hodin a levá zadní 168 hodin po použití příslušného induktoru (PBS/LPS/MDP).

Získaná suspenze buněk byla bakteriologicky vyšetřena. Toto vyšetření bylo provedeno kultivací na krevním agaru s 5 % propraných beraních erytrocytů a aerobní kultivací při 37 °C po dobu 24 hodin. Byl stanoven celkový počet buněk hemocytometrem a vitalita buněk trypanovou modří. Vitalita buněk byla vždy vyšší jak 97 %. Buněčná suspenze byla dále odstředěna po dobu 10 minut při 200 g a 4 °C. Buněčná peleta byla následně resuspendována v 1 ml supernatantu. Buňky byly adjustovány v mediu RPMI 1640 na 2×10^6 v 1 ml.

4.2 Detekce apoptózy lymfocytů

Apoptóza byla analyzována použitím Annexinu V (značeným FITC – fluorescein isothiocyanate) a propidium jodidu (PI) (Vermes et al, 1995). Byl použit Annexin-V-FLUOS Staining Kit (Boehringer Mannheim, GmbH, Mannheim, Německo), kdy bylo 500 μ l inkubačního pufru smícháno s 10 μ l Annexinu V a 10 μ l PI. Do 400 μ l suspenze buněk bylo přimícháno 100 μ l pracovního roztoku Annexinu V a PI. Po 15 minutách inkubace, která probíhala při laboratorní teplotě, bylo analyzováno 20.000 buněk.

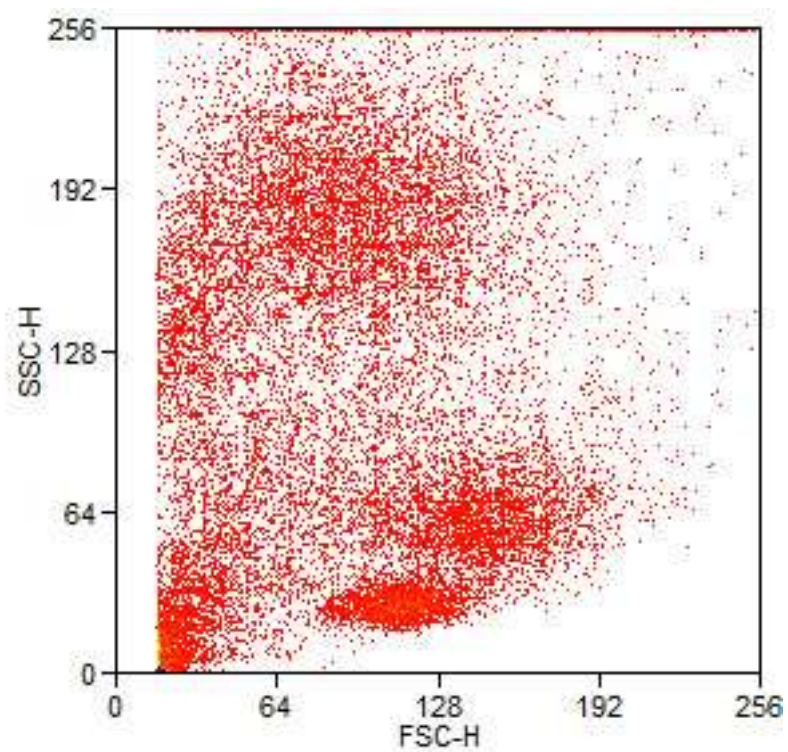
K analýze buněk byl použit průtokový cytometr FACS Calibur Apparatus (Becton Dickinson, Mountain View, California, USA) napojený na řídicí počítač Macintosh Quadra 650 (Apple Computer Inc., California, USA) vybavený softwarem CELLQuest(TM) (Becton Dickinson, Mountain View, California, USA), kterým byly pořízeny tzv. dot ploty. Tyto dot ploty byly následně vyhodnoceny za použití softwaru WinMDI 2.8 (Trotter, 2000).

Získaná data byla zobrazena na dot plotu s tzv. „light scatter parameters“. Tyto parametry jsou tvořeny:

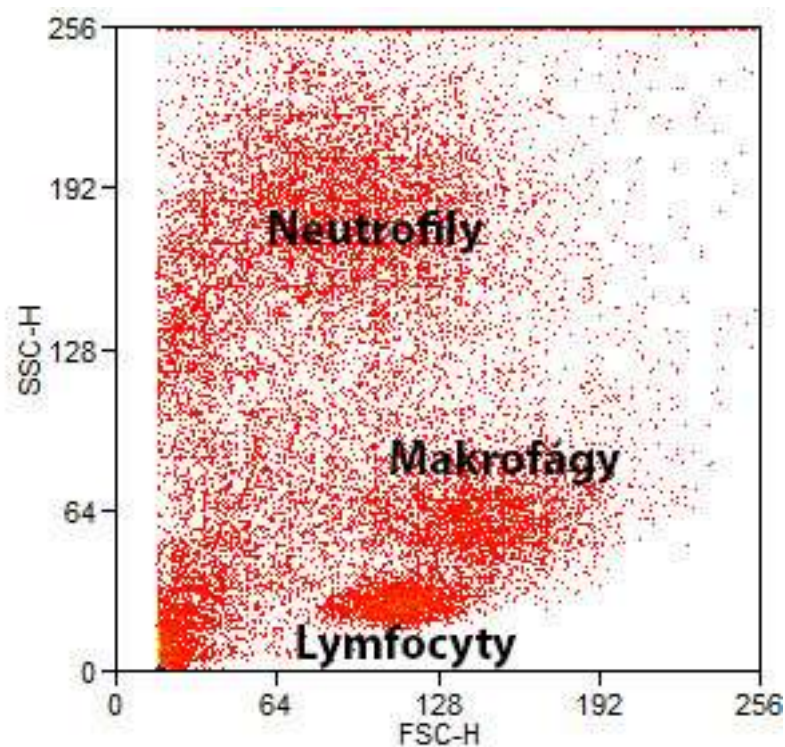
1. zastíněním čidla – parametr přímo úměrný velikosti buňky – tzv. „forward scatter parameter“ (FSC) determinovaný na ose x,
2. rozptylem excitačního světla pod úhlem 90° – parametr přímo úměrný stupni granulace cytoplazmy a polymorfii jádra buňky – tzv. „side scatter parameter“ (SSC) determinovaný na ose y.

Vzniklý dot plot byl generován pomocí excitačního laseru o vlnové délce 488 nm a vizualizoval regiony jednotlivých typů leukocytů podle jejich parametrů v měřicí komoře průtokového cytometru. Základní dot plot a dot plot s popisem regionů leukocytů jsou znázorněny na Obr. 1 a 2.

Obr. 1 Základní dot plot získaný průtokovým cytometrem s parametry FSC a SSC.

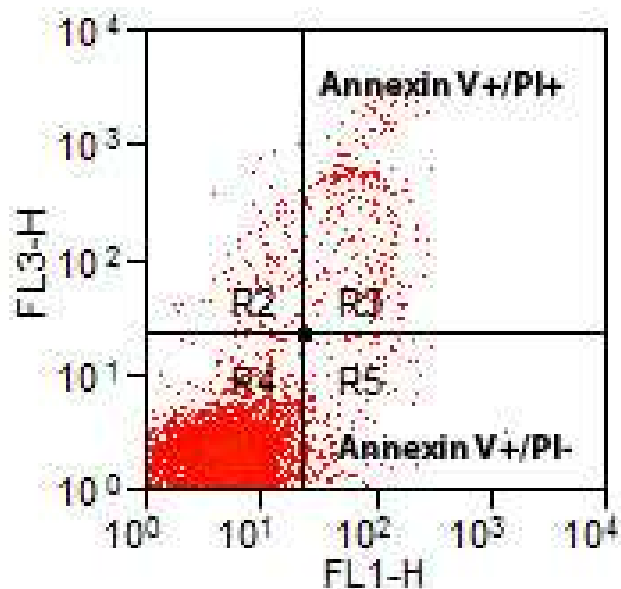


Obr. 2 Dot plot získaný průtokovým cytometrem s parametry FSC a SSC se znázorněním regionů jednotlivých leukocytů.



Podle výše zmíněných parametrů byly nejprve identifikovány jednotlivé typy buněk metodou dle Van Oostveldt et al. (1999). Poté byl diskriminován pouze region lymfocytů a po softwarové změně os FSC a SSC na osy FL1 a FL3 byla detekována pozitivita na Annexin V a PI. Na těchto dot plotech tak byly pomocí dvojbarevného značení vizualizovány živé, apoptotické a nekrotické neutrofilie generované diskriminací populace těchto buněk podle positivity na Annexin V (FITC+ determinované zelenou fluorescencí na ose x – FL1 s filtrem o prostupnosti 515 nm) a podle positivity na PI (PI+ determinované červenou fluorescencí na ose y – FL3 s filtrem o prostupnosti 600 nm) metodou dle Vermes et al. (1995) (Obr. 3).

Obr. 3 Dot plot znázorňující živé (*Annexin V-/PI-*), apoptotické (*Annexin V+/PI-*) a nekrotické lymfocyty (*Annexin V+/PI+*).



4.3 Detekce receptoru CD44

V experimentu byly použity následující primární a sekundární protilátky pro detekci receptoru CD44:

CD44 (BAG40A, mouse anti-ovine, VMRD inc. Pullman, Washington, USA) naředěný 1:50 a FITC značený IgG3 (SouthernBiotech, Birmingham, USA) naředěný 1:100.

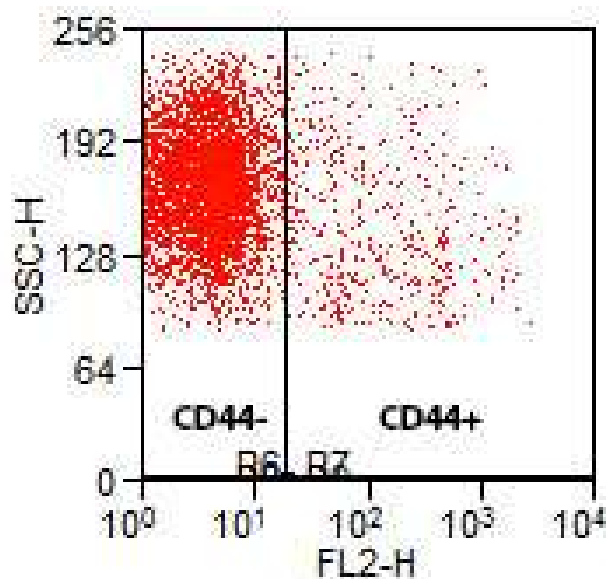
Konjugace protilátek pro analýzu v průtokovém cytometru byla provedena následovně:

- napipetování protilátek – 50 μ l antiCD44,
- napipetování 200 μ l buněčné suspenze 2×10^6 /ml,
- přidání kozího séra – 20 μ l,
- 15 minut inkubace při laboratorní teplotě,
- promytí hemolytickým činidlem (3 ml),
- odstředění – 5 minut, 200 g,
- slítí supernatantu,
- napipetování konjugátu – IgG1-R-PE, IgG3 FITC,
- inkubace 20 minut v lednici,

- resuspendace ve 3 ml cellwash roztoku,
- odstředění – 5 minut, 200 g,
- slítí supernatantu,
- přidání 100 µl cellwash roztoku
- a analýza v průtokovém cytometru.

Nejprve byly identifikovány jednotlivé typy buněk metodou dle Van Oostveldt et al. (1999). Následně byl diskriminován pouze region lymfocytů a po softwarové změně osy FSC na FL2 byly vizualizovány CD44+ lymfocyty generované diskriminací populace těchto buněk podle pozitivity na příslušný CD determinant (Obr. 4).

Obr. 4 Dot plot znázorňující CD44 pozitivní a CD44 negativní lymfocyty.



4.4 Detekce cytokinů

Experimenty byly zaměřeny na analýzu těchto cytokinů: TNF- α , IL-4, IL-10 a TGF β 1.

Suspenze buněk byly odstředěny a supernatanty jednotlivých vzorků byly zamraženy a uchovávány až do analýz při -80 °C. Před analýzou byly vzorky rozmraženy při laboratorní teplotě a koncentrace výše uvedených cytokinů byla zjišťována sendvičovou metodou ELISA. Pro stanovení koncentrace cytokinů bylo použito následujících komerčně dostupných kitů:

1. Bovine TNF-alpha DuoSet ELISA (R & D SYSTEMS),
2. IL-4 ELISA Reagent Kit, Bovine (Thermo Fisher Scientific),
3. Bovine interleukin 10 ELISA Kit (MyBioSource),
4. Human/Mouse TGF beta 1 ELISA Ready-SET-Go! (eBioscience).

4.4.1 Postup analýzy TNF- α

1. Naředění vázací protilátky v PBS na pracovní koncentraci. Napipetování 100 μ l naředěné protilátky do jamek kultivační 96 jamkové destičky. Zakrytí destičky a inkubace přes noc při laboratorní teplotě.
2. Odsátí všech jamek a promytí 3x promývacím roztokem (400 μ l do každé jamky). Kompletní odstranění tekutiny z každé jamky při každém kroku uvedeného postupu je nezbytné pro dosažení správného výsledku. Po posledním promytí odstranění zbývajících promývacího roztoku rychlým úderem plotny jamkami směřujícími k filtračnímu papíru a odsátí filtračním papírem.
3. Přidání 300 μ l ředícího činidla do každé jamky plotny. Inkubace při laboratorní teplotě minimálně 1 hodinu.
4. Opakování odsátí a promytí podle bodu č. 2. Poté jsou jamky mikrotitračních destiček připraveny pro přidání vzorků a standardů.
5. Přidání 100 μ l standardů a vzorků (dle potřeby naředěné v ředícím činidle) do jamek. Zakrytí jamek plotny a inkubace 2 hodiny při laboratorní teplotě.
6. Opakování odsátí a promývání podle bodu č. 2.
7. Přidání 100 μ l detekční protilátky (naředěné v ředícím činidle) do každé jamky. Zakrytí a inkubace 2 hodiny.

8. Opakování odsátí a promývání podle bodu č. 2.
9. Přidání 100 μ l pracovního roztoku Streptavidinu-HRP do každé jamky a inkubace 20 minut při laboratorní teplotě v temnu.
10. Opakování odsátí a promývání podle bodu č. 2.
11. Přidání 100 μ l roztoku substrátu do každé jamky. Inkubace 20 minut při laboratorní teplotě v temnu.
12. Přidání 50 μ l roztoku, který ukončuje reakci předchozích sloučenin, do každé jamky. Jemné poklepnání plotnou pro zajištění dokonalého promíchání.
13. Určení optické hustoty ihned po předchozím kroku, a to pomocí ELISA readru, při vlnové délce 450 nm.

4.4.2 Postup analýzy IL-4

1. Rozpuštění vázací protilátky 1:100 v karbonát-bikarbonát pufru přidáním 110 μ l protilátky do 10,89 ml pufru.
2. Přidání 100 μ l rozpuštěné protilátky do každé jamky plotny. Zakrytí plotny a inkubace přes noc při laboratorní teplotě.
3. Odsátí a přidání 300 μ l blokujícího pufru do každé jamky. Zakrytí jamek plotny a inkubace 1 hodinu při laboratorní teplotě.
4. Odsátí obsahu jamek a pokračování ve vlastní metodě ELISA.
5. Příprava standardu naředěním v ředícím činidle – koncentrace 2000 pg/ml.
6. Naředění standardu 1:2 v ředícím činidle, příprava série standardů o různých koncentracích (2000 pg/ml, 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,25 pg/ml, 15,625 pg/ml). Přidání 100 μ l standardů a vzorků do jamek destičky. Zakrytí jamek destičky a inkubace 1,5 hodiny při laboratorní teplotě.
7. Odsátí a promytí 3x promývacím roztokem použitím 300 μ l tohoto roztoku na každou jamku destičky.

8. Naředění detekční protilátky 1:100 v ředícím činidle přidáním 110 μ l detekční protilátky do 10,89 ml ředícího činidla.
9. Přidání 100 μ l naředěné detekční protilátky do každé jamky. Zakrytí jamek destičky a inkubace 1 hodinu při laboratorní teplotě.
10. Odsátí a promytí jamek, a to 3x, použitím 300 μ l promývacího roztoku na jamku.
11. Naředění Streptavidinu-HRP 1:400 v ředícím činidle přidáním 30 μ l Streptavidinu-HRP do 12ml ředícího činidla.
12. Přidání 100 μ l naředěného Streptavidinu-HRP do každé jamky. Zakrytí jamek destičky a inkubace 30 minut při laboratorní teplotě.
13. Odsátí a promytí jamek, a to 3x, použitím 300 μ l promývacího roztoku na jamku.
14. Přidání 100 μ l roztoku substrátu do každé jamky. Zakrytí jamek a inkubace 20 minut při laboratorní teplotě v temnu.
15. Zastavení reakce přidáním 100 μ l příslušného roztoku do každé jamky.
16. Změření absorbance při vlnové délce 450 nm.

4.4.3 Postup analýzy IL-10

1. Přidání 50 μ l standardů a vzorků do každé jamky destičky již pokrytých protilátkou.
2. Přidání 50 μ l HRP do každé jamky, poté 50 μ l protilátky do každé jamky. Důkladné zamíchání a inkubace 1 hodinu při teplotě 37 °C.
3. Odsátí každé jamky a 3x promytí přidáním 200 μ l promývacího roztoku do každé jamky (po dobu 10 sekund ponechání promývacího roztoku v jamkách a poté kompletní odstranění tekutiny z jamek).
4. Přidání 50 μ l substrátu A a 50 μ l substrátu B do každé jamky a dokonalé promíchání. Inkubace po dobu 15 minut při teplotě 37 °C v temnu.

5. Přidání 50 μ l roztoku do každé z jamek. Přidaný roztok zastaví probíhající reakci. Jemné promíchání.

6. Měření absorbance, a to do 10 minut, při vlnové délce 450 nm.

4.4.4 Postup analýzy TGF β 1

1. Pokrytí jamek mikrotitrační destičky (Corning Costar 9018) 100 μ l protilátky naředěné v pufru (Coating Buffer). Zakrytí jamek destičky a inkubace přes noc při teplotě 2 – 8 °C.

2. Odsátí jamek a 3x promytí 250 μ l promývacího roztoku na jamku. Působení promývacího roztoku po dobu 1 minuty pro vyšší účinek promývání. Odstranění veškeré tekutiny z jamek úderem destičky o filtrační papír.

3. Použití blokujícího roztoku (ELISA/ELISPOT Diluent) naředěného v deionizované vodě. Přidání 200 μ l do každé jamky. Inkubace 1 hodinu při laboratorní teplotě.

4. Odsátí a promytí alespoň 1x promývacím roztokem.

5. Aktivace vzorků kyselinou: přidání 100 μ l vzorku k 20 μ l 1N HCl. Inkubace po dobu 10 minut při laboratorní teplotě, poté neutralizování 20 μ l 1N NaOH. Při závěrečné kalkulaci koncentrace vzorků použití ředícího faktoru 1,4.

6. Naředění standardů v roztoku ELISA/ELISPOT Diluent. Přidání 100 μ l standardů do příslušných jamek. Přidání 100 μ l vzorků do příslušných jamek. Zakrytí jamek destičky a inkubace po dobu 2 hodin při laboratorní teplotě.

7. Odsátí jamek a 3x – 5x promytí 250 μ l promývacího roztoku na jamku. Působení promývacího roztoku po dobu 1 minuty pro vyšší účinek promývání. Odstranění veškeré tekutiny z jamek úderem destičky o filtrační papír.

8. Přidání 100 μ l detekční protilátky do každé jamky. Zakrytí jamek destičky a inkubace po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě.

9. Odsátí jamek a 3x – 5x promytí 250 μ l promývacího roztoku na jamku. Působení promývacího roztoku po dobu 1 minuty pro vyšší účinek promývání. Odstranění veškeré tekutiny z jamek úderem destičky o filtrační papír.

10. Přidání 100 μ l Avidinu-HRP do každé jamky. Zakrytí jamek destičky a inkubace po dobu 30 minut při laboratorní teplotě.

11. Odsátí jamek a 5x – 7x promytí 250 µl promývacího roztoku na jamku. Působení promývacího roztoku po dobu 1 minuty pro vyšší účinek promývání. Odstranění veškeré tekutiny z jamek úderem destičky o filtrační papír.

12. Přidání 100 µl roztoku TMB do každé jamky. Inkubace po dobu 15 minut při laboratorní teplotě.

13. Přidání 50 µl roztoku do každé jamky pro ukončení reakce.

14. Měření absorbance při vlnové délce 450 nm.

Vlastní měření koncentrace cytokinů proběhlo na mikrotitračních destičkách ve spektrofotometru Sunrise (Tecan, Rakousko) a následně byla zjištěna koncentrace cytokinů v programu Kim32 verze 5.15 (Kittrich, 2001).

4.5 Statistika

Absolutní počty leukocytů, procentické zastoupení leukocytů, procento apoptotických a CD44 pozitivních lymfocytů a koncentrace cytokinů byly prezentovány aritmetickým průměrem a směrodatnou odchylkou. Korelace mezi procentem apoptotických lymfocytů a CD44 pozitivními lymfocyty je prezentována korelačním koeficientem (r^2). Statistické rozdíly byly testovány párovým t-testem. Data byla zpracována programem STATISTICA 8.0 (StatSoft, 2007).

5 VÝSLEDKY

5.1 Zánětlivá odpověď mléčné žlázy

Intramamární aplikace PBS, LPS a MDP vyvolala odpověď mléčné žlázy. Ta byla charakteristická změnou celkového počtu buněk a diferenciálního počtu buněk (Tab. 1 a 2). Byl zaznamenán statisticky vysoce významný rozdíl ($P < 0,01$) v celkovém počtu leukocytů mezi PBS a LPS a mezi PBS a MDP po 24 a 48 hodinách po stimulaci mléčné žlázy. Po 72 a 168 hodinách byl rozdíl statisticky nevýznamný.

Tab. 1 Celkový počet leukocytů.

Použitý činitel	Doba po stimulaci mléčné žlázy (hodiny)	Průměr ($10^6/ml$)	Směrodatná odchylka
PBS (kontrola)	24	12,6	1,8
	48	4,1	1,7
	72	3,1	1,5
	168	0,9	0,3
LPS	24	47,2	9,8
	48	14,3	6,2
	72	5,8	1,7
	168	1,4	0,4
MDP	24	30,7	6,3
	48	11,1	5,3
	72	4,0	1,8
	168	1,5	0,7

V počáteční fázi zánětlivé odpovědi, tj. 24 hodin po stimulaci mléčné žlázy, převažovaly v buněčné populaci neutrofily nad makrofágy a lymfocyty. Během dalšího průběhu zánětlivé odpovědi se zastoupení neutrofilů postupně snižovalo. Naopak narůstal podíl makrofágů v buněčné populaci. Statisticky vysoce významný rozdíl ($P < 0,01$)

v zastoupení lymfocytů byl zaznamenán mezi kontrolou a při použití LPS, a to 48 a 168 hodin po stimulaci mléčné žlázy. Procento lymfocytů narůstalo s poklesem podílu neutrofilů v průběhu zánětlivé odpovědi. Statisticky vysoce významný rozdíl ($P < 0,01$) v zastoupení lymfocytů byl zaznamenán také mezi kontrolou a při použití MDP, ale pouze 168 hodin od stimulace mléčné žlázy.

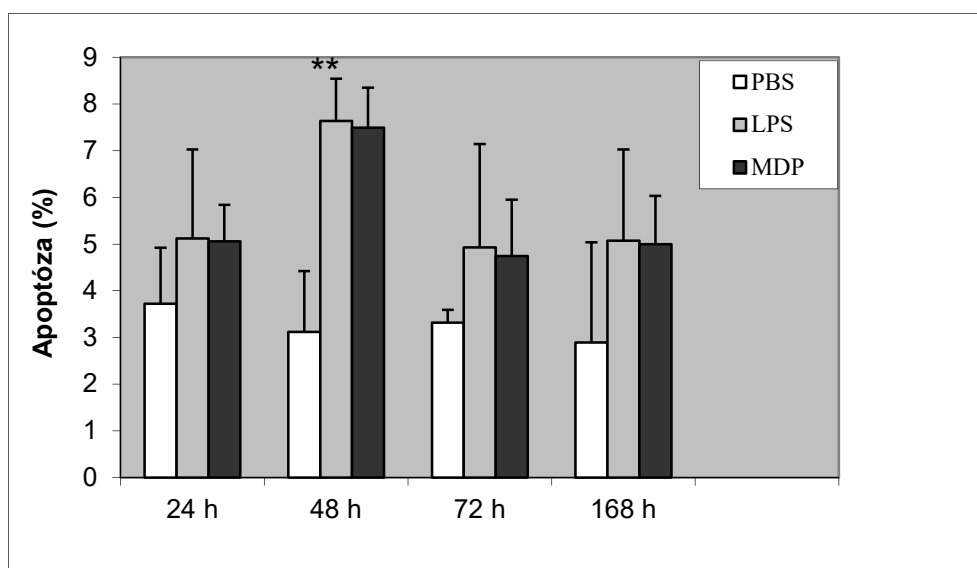
Tab. 2 Diferenciální počet leukocytů mléčné žlázy.

Použitý činitel	Leukocyty	24 h (%±SD)	48 h (%±SD)	72 h (%±SD)	168 h (%±SD)
PBS (kontrola)	Neutrofily	62,5±7,2	40,7±15,1	22,6±5,8	12,3±4,7
	Makrofágy	31,7±9,8	37,0±8,9	59,8±10,1	80,4±13,7
	Lymfocyty	5,8±3,2	22,3±6,9	17,6±5,9	7,3±1,2
LPS	Neutrofily	85,7±8,9	80,3±9,1	50,7±11,8	31,2±8,7
	Makrofágy	12,1±1,8	14,1±3,4	37,4±9,5	49,1±9,5
	Lymfocyty	2,2±0,8	5,6±1,1	11,9±2,3	19,7±3,3
MDP	Neutrofily	80,2±8,5	55,1±5,9	30,5±8,9	15,9±4,1
	Makrofágy	10,6±3,2	26,7±5,6	45,7±10,3	63,6±8,4
	Lymfocyty	9,2±3,0	18,2±4,8	23,8±5,8	20,5±5,6

5.2 Apoptóza lymfocytů v průběhu zánětlivé odpovědi

Apoptóza lymfocytů byla zaznamenána během zánětlivé odpovědi vyvolané LPS a MDP. Při použití PBS však byla apoptóza lymfocytů rovněž detekována. Podíl apoptotických lymfocytů (Annexin V+/PI+) dosáhl maxima 48 hodin po indukci zánětlivé odpovědi, a to při použití LPS i MDP. Mezi těmito induktory nebyl zaznamenán statistický rozdíl v procentu apoptotických lymfocytů. Statisticky vysoce významný rozdíl ($P < 0,01$) mezi PBS a LPS a mezi PBS a MDP byl zaznamenán právě 48 hodin po stimulaci zánětlivé odpovědi (Obr. 5).

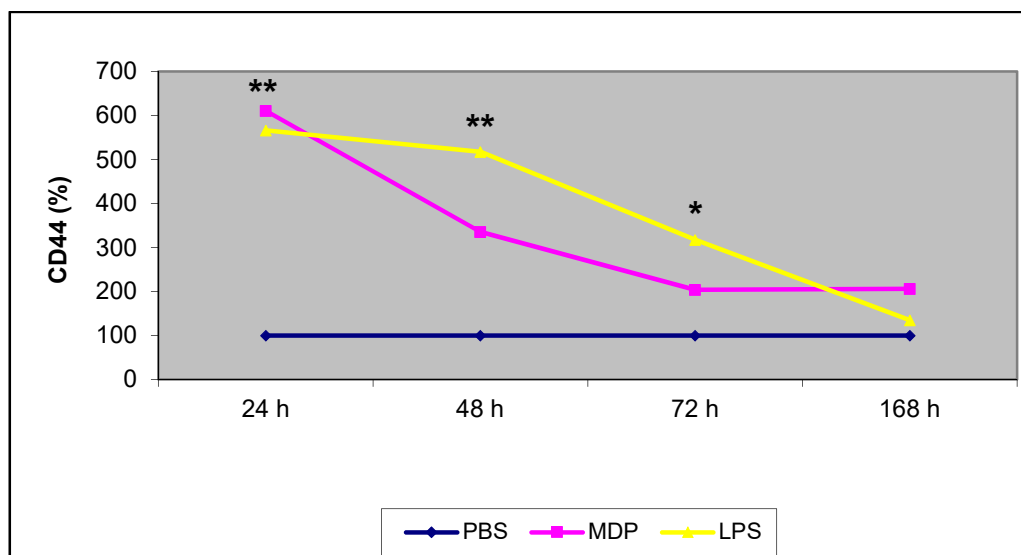
Obr. 5 Zastoupení apoptotických lymfocytů – porovnání PBS s LPS a MDP.



5.3 Podíl CD44+ lymfocytů v průběhu zánětlivé odpovědi

Jak je z Obr. 6 patrné, došlo k významnému nárůstu ($P < 0,01$) CD44 pozitivních lymfocytů již v prvních fázích zánětlivé odpovědi (24 a 48 hodin po stimulaci mléčné žlázy), a to při porovnání kontroly (PBS) s oběma pokusnými zásahy (LPS a MDP). Za 72 hodin po stimulaci byl zaznamenán statisticky významný rozdíl ($P < 0,05$) mezi kontrolou a pokusnými zásahy. Rozdíl mezi LPS a MDP 48 a 72 hodin po stimulaci mléčné žlázy byl signifikantní ($P < 0,05$). Při použití LPS byl zaznamenán pozvolnější pokles procenta CD44+ lymfocytů.

Obr. 6 Zastoupení CD44+ lymfocytů – porovnání PBS s LPS a MDP. Kontrola (PBS) byla stanovena jako 100 %. U pokusných zásahů (LPS a MDP) je vyjádřen procentický nárůst CD44 pozitivních lymfocytů.



Při experimentech byla zaznamenána střední korelace mezi podílem apoptotických lymfocytů a CD44+ lymfocyty, a to 24 hodin od stimulace při použití LPS i MDP. Za 48 hodin po stimulaci zánětlivé odpovědi byla zaznamenána velmi silná korelace mezi výše uvedenými parametry (Tab. 3).

Tab. 3 Korelace mezi podílem apoptotických lymfocytů a CD44+ lymfocytů.

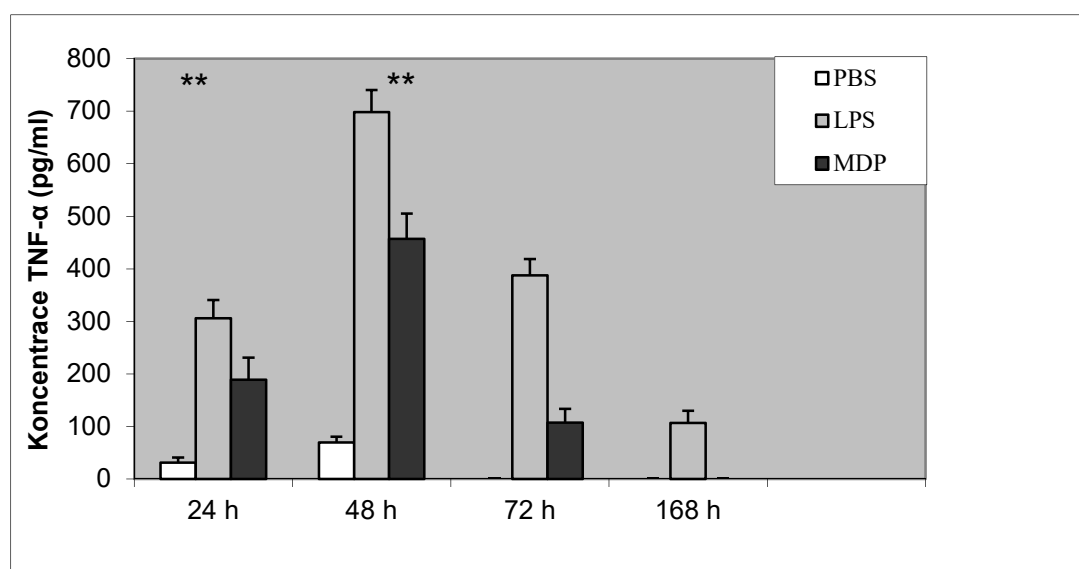
Použitý činitel	Doba po stimulaci mléčné žlázy (hodiny)	Korelace (r²)	Statistická významnost
LPS	24	0,591	P<0,05
	48	0,904	P<0,01
	72	0,341	-
	168	0,301	-
MDP	24	0,617	P<0,05
	48	0,920	P<0,01
	72	0,418	-
	168	0,364	-

5.4 Produkce cytokinů v průběhu zánětlivé odpovědi mléčné žlázy

5.4.1 Produkce TNF- α

V experimentech byl zaznamenán nárůst ($P < 0,01$) produkce TNF- α při použití LPS a MDP v porovnání s kontrolou. Byl zjištěn také signifikantní rozdíl ($P < 0,01$) mezi LPS a MDP, kdy LPS stimulovalo produkci tohoto cytokinu výrazněji (Tab. 4).

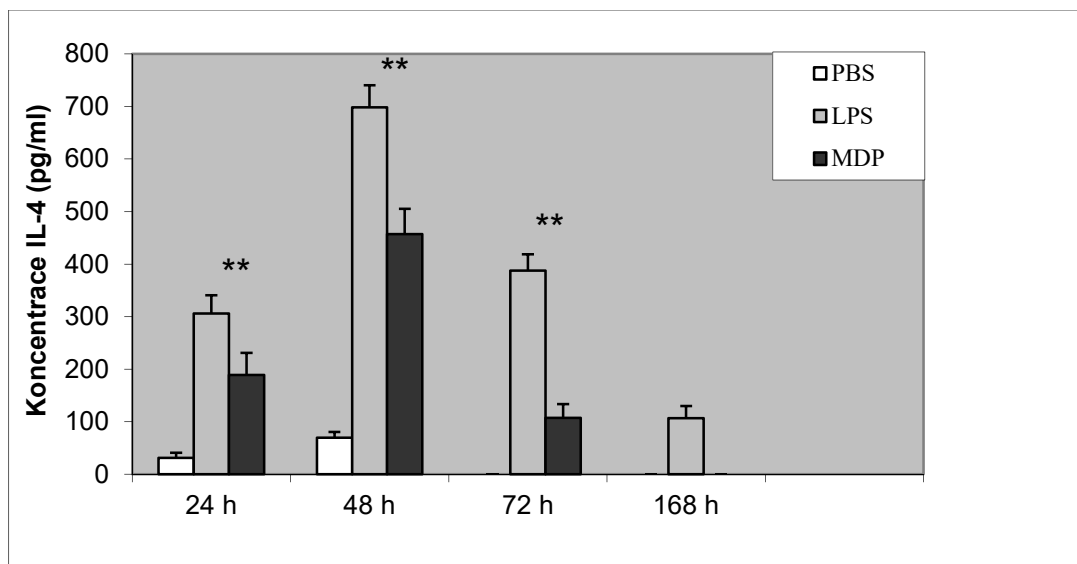
Tab. 4 Koncentrace TNF- α po stimulaci mléčné žlázy pomocí PBS, LPS a MDP.



5.4.2 Produkce IL-4

Při analýze cytokinu IL-4 byl zjištěn nárůst jeho koncentrace při pokusných zásazích (LPS a MDP) do 48 hodin od stimulace zánětlivé odpovědi. Byl zaznamenán vysoce signifikantní rozdíl ($P < 0,01$) ve prospěch induktoru LPS. Od 72 hodin byl zaznamenán pokles koncentrace IL-4. Při použití MDP již nebyla 168 hodin po stimulaci koncentrace IL-4 naměřena (koncentrace byla pod detekční limit metody) (Tab. 5).

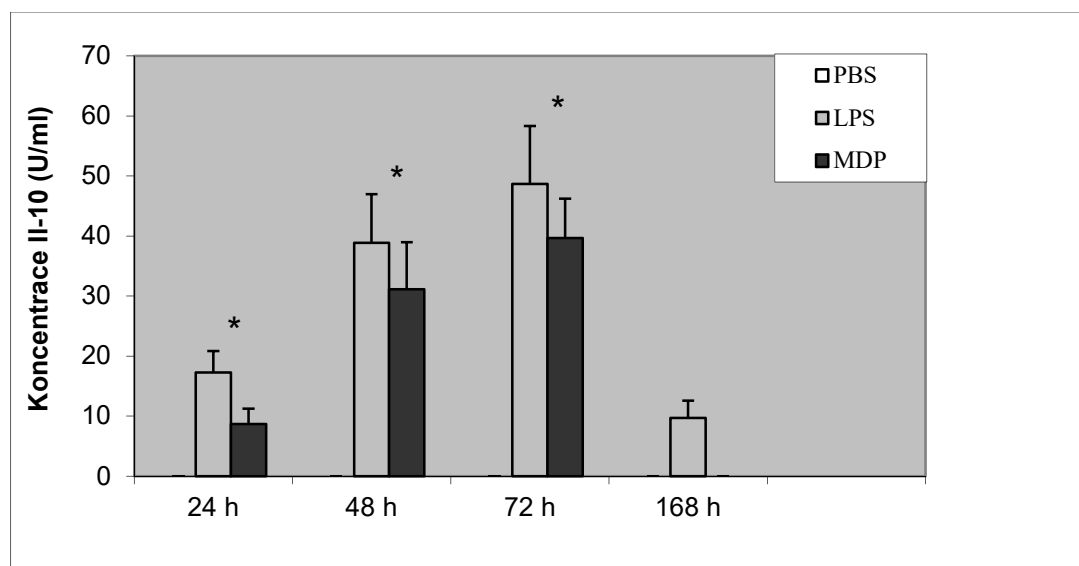
Tab. 5 Koncentrace IL-4 po stimulaci mléčné žlázy pomocí PBS, LPS a MDP.



5.4.3 Produkce IL-10

Při kontrole, čili při použití PBS, nebyl detekován IL-10 v průběhu celého experimentu. U LPS byl zaznamenán nárůst koncentrace IL-10 do 72 hodin od stimulace, stejně jako u MDP. U MDP však nebyl detekován v posledním časovém bodě (168 hodin). Byl zjištěn signifikantní rozdíl v koncentraci IL-10 ($P < 0,05$) ve prospěch induktoru LPS (Tab 6).

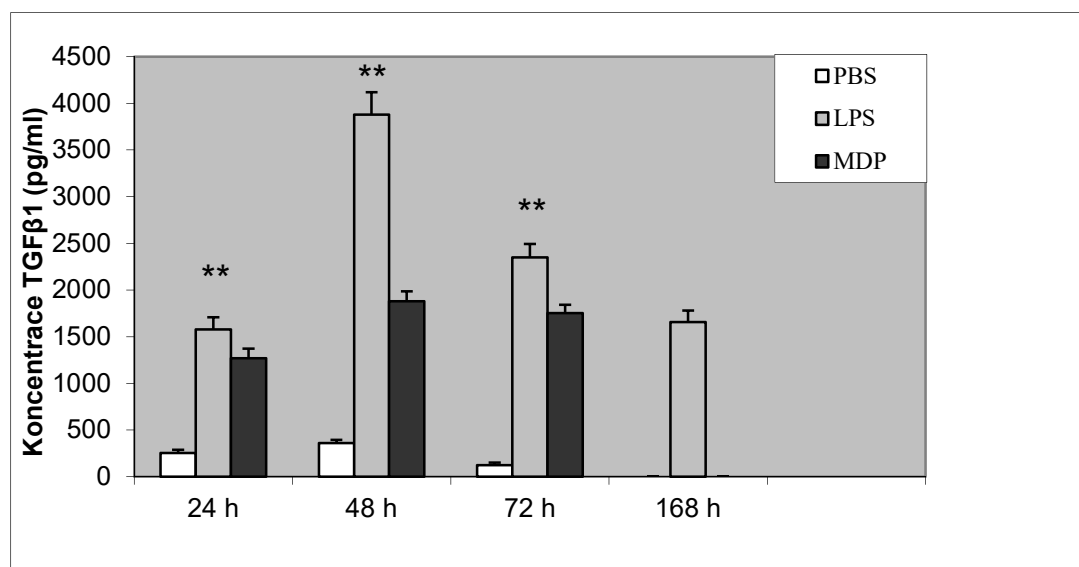
Tab. 6 Koncentrace IL-10 po stimulaci mléčné žlázy pomocí PBS, LPS a MDP.



5.4.4 Produkce TGF- β 1

Nejvyšší koncentrace TGF- β 1 byly naměřeny při použití induktoru LPS. Při porovnání s kontrolou i MDP byl zaznamenán vysoce signifikantní rozdíl ($P < 0,01$) s tím, že u kontroly a MDP nebyl zjištěn tento cytokin 168 hodin po stimulaci zánětlivé odpovědi. U kontroly, ale i pokusných zásahů, došlo k nárůstu koncentrace do 48 hodin, poté došlo k jejímu snížení (Tab. 7).

Tab. 7 Koncentrace TGF- β 1 po stimulaci mléčné žlázy pomocí PBS, LPS a MDP.



6 DISKUSE

Experimenty disertace byly zaměřeny na detekci apoptotických lymfocytů, CD44+ lymfocytů a zánětlivých cytokinů (TNF- α , IL-4, IL-10, TGF β 1), a to po vyvolání zánětlivé odpovědi mléčné žlázy pomocí LPS a MDP.

Apoptóza lymfocytů může být ovlivněna řadou patogenních bakterií (Lancellotti et al., 2006). Bakteriální infekci způsobují jak Gram-pozitivní, tak i Gram-negativní bakterie (Carrero a Unanue, 2006). Sláma et al. (2009c) uskutečnili experiment na 40 mléčných žlázách 10 klinicky zdravých jalovic. Nejprve do všech mléčných žláz aplikovali fyziologický roztok. Po 24 hodinách provedli výplach prvních čtvrtí mléčných žláz. Druhé čtvrtě vypláchli za 48 hodin, třetí po 72 hodinách a poslední čtvrtě vypláchli po 168 hodinách po aplikaci fyziologického roztoku. Takto získané výplachy sloužily jako kontrolní vzorky. V experimentální části bylo 5 jalovic infikováno Gram-pozitivní bakterií *Staphylococcus aureus*. Zbýlých 5 zvířat infikovali Gram-pozitivní bakterií *Streptococcus uberis*. U všech jalovic tímto byla vyvolána subklinická mastitida. Vzorky byly odebrány po 24 až 168 hodinách. Pomocí průtokového cytometru zjistili, že 24 hodin po intramamární aplikaci fyziologického roztoku, bakterie *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus uberis* byl počet lymfocytů nejnižší. Nejvyšší procento lymfocytů zaznamenali 168 hodin po infekci bakteriemi *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus uberis*. V disertační práci bylo rovněž procento lymfocytů nejnižší 24 hodin po aplikaci PBS, LPS a MDP. Největší zastoupení lymfocytů pak nastalo 72 hodin po stimulaci pomocí MDP a 168 hodin po stimulaci pomocí LPS.

Apoptóza lymfocytů byla autory detekována po aplikaci fyziologického roztoku a stejně tak byla zjištěna během 24 – 168 hodin po stimulaci mléčných žláz výše zmíněnými Gram-pozitivními bakteriemi. Vzhledem k tomu, že při použití PBS (kontrola) bylo procento apoptózy prokazatelně vyšší, autoři usuzují, že uvedené Gram-pozitivní bakterie mohou oddalovat proces apoptózy lymfocytů (Sláma et al., 2009c). Tyto výsledky nekorelují s výsledky v předkládané práci, kde byl klinicky zdravým jalovicím intramamárně aplikován MDP, který je součástí buněčné stěny Gram-pozitivních bakterií. Výsledkem aplikace byl signifikantní nárůst procenta apoptotických lymfocytů po 48 hodinách od stimulace mléčné žlázy.

Escherichia coli je Gram-negativní bakterie, která při lýze uvolňuje ze své buněčné stěny do těla hostitele endotoxin LPS (Markey et al., 2013). Tento bakteriální endotoxin dokáže pozměnit životnost leukocytů mléčné žlázy. Ve své studii se Sláma et al. (2009b) zaměřili na apoptózu bovinních lymfocytů v *in vitro* prostředí vyvolanou právě pomocí LPS, a to ve třech různých koncentracích (0,2; 2,0 a 20 μ g/ml) za použití buněk získaných výplachem mléčných žláz jalovic. Závěrem jejich práce je potvrzení hypotézy, že apoptóza lymfocytů je oddálena působením endotoxinu LPS v *in vitro* podmínkách a dále také fakt, že nebyly objeveny žádné signifikantní rozdíly mezi použitými koncentracemi LPS. Ačkoli prezentovaná práce byla provedena v *in vivo* podmínkách, po aplikaci endotoxinu LPS došlo k signifikantnímu nárůstu procenta apoptotických lymfocytů až po 48 hodinách od stimulace mléčné žlázy jalovic. Je tedy možné, že endotoxin LPS dokáže apoptózu lymfocytů oddálit jak v podmínkách prostředí *in vitro*, tak v *in vivo*. Pokud však porovnáme kontrolu, kde byl použit fyziologického roztok, se stimulací mléčné žlázy pomocí LPS, je patrné, že LPS vyvolal změnu v procesu apoptózy u lymfocytů a došlo k nárůstu podílu apoptotických lymfocytů, i když signifikantní rozdíl byl zaznamenán až po 48 hodinách od stimulace mléčné žlázy. Zůstává tedy otázkou, zda na LPS reagují lymfocyty jinak v *in vitro* podmínkách než v *in vivo* podmínkách. Musíme mít však na paměti, že *in vitro* pokusy mohou být zavádějící a jedná se pouze o stimulaci buněk s tím výsledkem, že se buňky mohou chovat nebo mohou reagovat nějakým způsobem. V mikroenvironmentu tkáně je však obrovské množství faktorů, které mohou výsledný efekt bakterií, jejich komponent, nebo toxinů zcela změnit. V mléčné žláze je např. jistě mnohem komplexnější kombinace cytokinů, které mohou významně ovlivňovat apoptózu různých buněk, nejenom lymfocytů.

Sládek a Ryšánek (2009) provedli pokus, kdy na 40 mléčných žlázách 10 bakteriologicky vyšetřených a zdravých jalovic, zjišťovali vliv MDP a LPS na procentické zastoupení lymfocytů, neutrofilů a makrofágů. Všechna zvířata byla nejprve ošetřena fyziologickým roztokem pro získání kontrolních vzorků. O měsíc později bylo 5 jalovicím aplikováno 500 μ g MDP a zbylým 5 pak 5 μ g LPS. Počet buněk byl při použití MDP nebo LPS vyšší oproti počtu buněk získaných z mléčné žlázy, která byla ošetřena pouze fyziologickým roztokem. Čili buněčná zánětlivá odpověď byla signifikantně vyšší při podání MDP a LPS oproti aplikaci fyziologického roztoku. Tento fakt byl potvrzen také předkládanou disertační prací.

Zánětlivá odpověď mléčné žlázy v práci Sládka a Ryšánka (2009) byla charakteristická také zvýšením procenta neutrofilů. Neutrofilů tvořily převažující typ buněk v populaci buněk získaných 24 hodin po aplikaci MDP nebo LPS. Neutrofilů bylo o více než 80 % více za 24 hodin po aplikaci MDP nebo LPS při porovnání s výsledkem získaným po použití fyziologického roztoku. Během 24 až 168 hodin po vyvolání zánětlivé odpovědi procento neutrofilů postupně klesalo, zejména pak v mléčné žláze ošetřené fyziologickým roztokem. Po 168 hodinách po aplikaci došlo ke zvýšení procenta makrofágů. Pokles počtu buněk a zastoupení neutrofilů a zároveň zvýšení procenta makrofágů vyjadřovali rezoluční fázi zánětu mléčné žlázy. Procento neutrofilů výrazněji a rychleji klesalo po ošetření fyziologickým roztokem, oproti ošetření mléčné žlázy pomocí MDP nebo LPS. Neošetřená mléčná žláza vykazovala vyšší procento makrofágů než lymfocytů a neutrofilů.

Změny v diferenciálním počtu leukocytů v uvedené práci jsou v souladu s výsledky předkládané disertační práce, kdy při zvýšení procentického zastoupení neutrofilů v iniciační fázi zánětu je nižší zastoupení lymfocytů. Při snižování procenta neutrofilů v pozdějších fázích zánětu dochází k nárůstu procentického zastoupení lymfocytů.

V prezentované práci bylo ze získaných výsledků patrné, že došlo k významnému nárůstu CD44+ lymfocytů po intramamární aplikaci MDP nebo LPS. CD44 se běžně využívá jako diagnostický či prognostický marker některých humánních zhoubných onemocnění (Naor et al., 1997). Receptor CD44 se vyskytuje na mnoha typech buněk, které se účastní zánětu. Jedná se například o neutrofilů a makrofágy. Většina funkcí CD44 závisí právě na jeho schopnosti vázat kyselinu hyaluronovou (Ponta et al., 1994). Kyselina hyaluronová reguluje zánět a hojení tkáně. Při zánětu nebo zranění tkáně je kyselina hyaluronová signifikantně více polydisperzní a obsahuje variaci polymerů, jejichž funkce se mohou překrývat. Přilnavost molekul CD44 k matrixu kyseliny hyaluronové je závislá na kompozici proteinů tvořící kyselinu. Endoteliální buňky s nedostatkem CD44 jsou stále schopné vázat kyselinu hyaluronovou a běžně migrovat, a to díky kompenzaci receptorem RHAMM (receptor for HA-mediated mobility) (Petrey a de la Motte, 2014). Sládek a Ryšánek (2009) konstatovali signifikantní nárůst procenta CD44+ nevakuoalizovaných makrofágů 24 hodin po aplikaci MDP nebo LPS oproti kontrolní skupině za použití fyziologického roztoku. Během fáze rezoluce zánětu autoři pozorovali pozvolný pokles v celkovém procentickém zastoupení CD44+ nevakuoalizovaných

makrofágů. Pokles byl statisticky významný po 48 a 72 hodinách po aplikaci LPS nebo MDP. Procento CD44+ vakuolizovaných makrofágů bylo po 24 hodinách po podání LPS nebo MDP nižší ve srovnání s kontrolní skupinou. Během rezoluční fáze zánětu mléčné žlázy došlo ke zvýšení celkového počtu CD44+ vakuolizovaných makrofágů. Langrová et al. (2008) demonstrovali obdobný trend, avšak jejich experiment byl zaměřen na neurofily. Použili celkem 8 klinicky zdravých jalovic, jejichž mléčné žlázy byly bakteriologicky vyšetřeny před započítáním experimentu. Schéma experimentu bylo obdobné jako u Sládka a Ryšánka (2009). Intramamární podání MDP a LPS vyvolalo zánětlivou odpověď změnami v celkovém počtu a diferenciálním počtu buněk. Zánětlivá reakce proběhla ve dvou fázích, a to v iniciační a rezoluční. Ve fázi iniciační nastalo největší zvýšení celkového počtu buněk 24 hodin po aplikaci LPS, poté následovalo zvýšení celkového počtu buněk po aplikaci MDP a nejnižší zvýšení vyvolalo podání fyziologického roztoku. Statistiky průkazné ($P < 0,01$) byly rozdíly mezi LPS a MDP oproti PBS. Poté autoři zaznamenali pozvolný pokles celkového počtu neutrofilů u všech použitých induktorů. V iniciační fázi, čili 24 hodin po aplikaci induktorů, převládali neutrofily nad lymfocyty a makrofágy. Rezoluční fáze zánětu proběhla rychleji u kontrolní skupiny, než tomu bylo u skupin s použitím induktorů LPS a MDP. Apoptózu neutrofilů zmíněný kolektiv autorů zaznamenal u všech použitých induktorů. Maximálních hodnot bylo dosaženo po 72 hodinách, kdy k největšímu nárůstu došlo u kontrolní skupiny.

V iniciační fázi zánětu, po aplikaci PBS, autoři pozorovali postupné zvyšování CD44+ neutrofilů. Zatímco podstatně nižší počet ($P < 0,01$) jich zaznamenali po 24 hodinách, 48 hodinách ($P < 0,05$) a 72 hodinách ($P < 0,01$) po aplikaci LPS a MDP. V porovnání s LPS a MDP, Langrová et al. (2008) zjistili statisticky průkazně ($P < 0,01$) nižší počet CD44+ neutrofilů 168 hodin po aplikaci PBS. Během všech pokusných period za použití MDP, signifikantně koreloval počet CD14+ neutrofilů s počtem CD44+ neutrofilů. U LPS induktoru došlo k signifikantní korelaci pouze v iniciační fázi zánětu. Autoři tím došli k závěru, že počet CD44+ neutrofilů je během iniciační fáze zánětu nízký a nejeví se jako marker pro aktivaci neutrofilů. Z výsledků prezentované práce takovýto trend u lymfocytů nevyplýval. Největšího počtu CD44+ lymfocytů bylo dosaženo právě v iniciační fázi. Poté nastal jejich pokles s tím, že u induktoru LPS byl pokles pozvolnější.

Cytokiny jsou malé signální bílkoviny, které mohou být produkovány různými typy buněk. V organismu plní funkci signálů intracelulární komunikace. Takováto komunikace probíhá např. právě během zánětu (Belardelli a Ferrantini, 2002). Klíčovým prozánětlivým cytokinem, aktivujícím vrozenou i získanou imunitní odpověď, je TNF- α (Weinberg a Buchholz, 2006). Jedná se o významný cytokin při koliformních mastitidách, jelikož indukuje syntézu haptoglobinu a zároveň vyvolává vyplavení neutrofilů z krevního řečiště do tkání a aktivuje neutrofile (Blum et al., 2000). Při přirozeně se vyskytující koliformní mastitidě, experimentálně vyvolané mastitidě pomocí bakterie *E. coli* a při intramamárním podání LPS dochází ke zvýšené hladině tohoto cytokinu v mléce a v séru (Hisaeda et al., 2001). V předkládané práci došlo k maximální produkci TNF- α 24 hodin po aplikaci LPS. Po 48 hodinách hladina značně klesla, avšak stále byla vyšší v porovnání s kontrolou.

Při mastitidě vyvolané Gram-pozitivní bakterií *Staphylococcus aureus*, produkce TNF- α není kontinuální. Hladina tohoto cytokinu se v tomto případě zvedne pouze na krátkou dobu po bakteriální infekci a poté prudce klesá (Yokomizo et al., 1995). Yokomizo et al. (1995) provedli experiment, kde aplikovali různé exoproteiny produkované bakterií *Staphylococcus aureus* na mononukleární buňky z periferní krve. Periferní krev získali celkem od 3 zdravých telat ve věku 4 až 7 dní. Vyizolovali z ní neadherující mononukleární buňky, které stimulovali pomocí různých stafylokokových toxinů. Vyhodnocení buněk proběhlo pomocí průtokové cytometrie. Hodnoty TNF- α a IFN- γ byly detekovány pomocí sendvičové ELISA metody. Největší nárůst mononukleárních buněk nastal po 72 hodinách stimulace při koncentraci 100 ng/ml u všech použitých toxinů. Různé toxiny vyjadřovali optimální reakci při různých koncentracích. Mononukleární buňky stimulované stafylokokovými toxiny o koncentraci 100 ng/ml vykazovali zvýšenou produkci IL-2 a TNF- α a nižší produkci INF- γ . Nejvyšší produkce cytokinů IL-2 a TNF- α bylo dosaženo 48 hodin po stimulaci. Poté nastalo pozvolné klesání až do 96. hodiny po stimulaci. Naopak, zvyšující se hladina cytokinu INF- γ byla zaznamenána při prodloužení stimulační doby nad 96 hodin. Při stimulaci buněk odstupňovanými koncentracemi toxinů po dobu 48 hodin autoři zjistili, že produkce jmenovaných cytokinů může být vyvolána již při koncentracích od 10 do 100 pg/ml. Nejvyšší produkce IL-2, TNF- α a INF- γ bylo dosaženo při koncentraci 100 ng/ml. Výsledky dosažené autorským kolektivem Yokomizo (1995) se shodují s výsledky v předkládané práci. K nejvyšší produkci TNF- α došlo 24 hodin po stimulaci pomocí

MDP. Po 48 hodinách nastal pokles. Koncentrace TNF- α dosažené po 72 a 168 hodinách byly nízké natolik, že nebylo možné detekovat jejich hodnoty.

IL-4 je prozánětlivý cytokin, který se podílí na přímé odpovědi Th2 buněk vůči parazitické infekci (Zamorano et al., 2003). Je stěžejní také při bakteriální infekci, kdy udržuje rovnovážný stav organismu během jeho zánětu a imunitní odpovědi (Schook a Tumbleson, 1997). Je známo, že IL-4 řídí také apoptózu některých buněk (Zamorano et al., 2003). Vzhledem k dosaženým výsledkům v této disertační práci, lze usuzovat, že IL-4 se podílí na regulaci apoptózy lymfocytů v průběhu zánětu mléčné žlázy, jelikož nejvyšší produkce tohoto cytokinu nastala 48 hodin po stimulaci, což odpovídá maximální apoptóze lymfocytů v průběhu zánětu vyvolaného pomocí LPS a MDP.

IL-10 je rovněž prozánětlivým cytokinem. Jeho produkce makrofágy může být stimulována některými bakteriálními patogeny (Sing et al., 2002). Delogu et al. (2001) vyslovili hypotézu, že zvýšená produkce cytokinu IL-10 je spojena s apoptózou lymfocytů. IL-6 naopak apoptózu T buněk inhibuje (Atreya et al., 2000).

Sipka et al. (2013) zkoumali produkci cytokinů v mléce a v séru, a to na 6 holštýnko-fríských dojnících. Levou přední a obě zadní čtvrtě každé dojnice infikovali bakterií *E. coli*. Pravá přední čtvrt' pak sloužila jako kontrola. Po 4 hodinách od aplikace *E. coli* byly obě zadní čtvrtě každé dojnice léčeny antibiotiky. Vzorky mléka a krve byly odebrány ještě před samotnou bakteriální aplikací každých 48 hodin a po aplikaci každých 6 hodin. Po začátku léčby pak každé 4 hodiny. Koncentrace cytokinů byly zjišťovány metodou ELISA. Závěrem bylo, že pouze mléko ze čtvrtí, které byly infikovány a neléčeny, vykazovalo zvýšený obsah cytokinů IFN- γ , IL-1 β a IL-10. IFN- γ začal nabývat na hodnotách 24 hodin po stimulaci a maxima dosáhl za 36 hodin. IL-10 byl měřitelný 18 hodin po aplikaci a zůstal ve stejné koncentraci až do 36 hodin po stimulaci. Poté jeho hladina klesla, ale byla stále měřitelná. V léčených čtvrtích nebo čtvrtích, které nebyly infikovány, byly hodnoty cytokinů IFN- γ , IL-1 β a IL-10 velmi nízké, nebo nešly detekovat vůbec. Pouze IL-4 byl měřitelný v mléce ze čtvrti, která byla léčena. Infikované neléčené čtvrtě vykazovali nejvyšší koncentraci 24 hodin po aplikaci. Nejnižší hladina byla naměřena po 36 hodinách od aplikace.

V předkládané práci bylo po stimulaci pomocí LPS dosaženo maximálních hodnot IL-4 48 hodin po aplikaci. S časem jeho hladina klesala. Zatímco IL-10 nabýval na hodnotách,

kulminoval 72 hodin po aplikaci, poté prudce klesal. Luan et al. (2012) však uvádí, že LPS může tlumit produkci IL-4.

Po stimulaci pomocí MDP dosáhl IL-4 v prezentované práci svého maxima rovněž 48 hodin po aplikaci, stejně jako tomu bylo u induktoru LPS. IL-10 maxima dosáhl také až po 72 hodinách po aplikaci. Hodnoty obou cytokinů byly vyšší ve srovnání s kontrolou, avšak jejich hodnoty byly poměrně nízké.

Hessle et al. (2000) stimulovali monocyty 9 dárců 7 Gram-negativními a 7 Gram-pozitivními bakteriemi. Ve své práci se zaměřili na koncentrace IL-10 a IL-12 v séru mononukleárních buněk periferní krve. Stanovení bylo provedeno sendvičovou metodou ELISA. Po 24 hodinách od stimulace byly hladiny IL-10 a IL-12 nejvyšší. Bez ohledu na použitou koncentraci bakterií, Gram-pozitivní bakterie vyvolaly vyšší produkci IL-12 v porovnání s Gram-negativními bakteriemi. Naopak, Gram-negativní bakterie více stimulovaly produkci IL-10 v porovnání s Gram-pozitivními bakteriemi. Ke stejnému závěru autoři došli při všech použitých koncentracích. V předkládané disertační práci byla produkce IL-10 také vyšší při použití LPS Gram-negativní bakterie *E.coli* oproti MDP.

TGF- β 1 je protizánětlivý cytokin podílející se na imunitní odpovědi organismu během infekčního onemocnění (Peralta-Zaragoza et al., 2001). Po stimulaci LPS začala jeho koncentrace v předkládané práci stoupat. Maxima dosáhla po 48 hodinách. Následoval pozvolný pokles. Po stimulaci MDP bylo maxima rovněž dosaženo po 48 hodinách, avšak hodnoty TGF- β 1 byly prokazatelně nižší ve srovnání s LPS. Stejně tak Cross et al. (2004) zaznamenali, že dochází k rozdílné produkci, nejen TGF- β 1, po stimulaci Gram-pozitivními nebo Gram-negativními kmeny bakterií. Autoři k tomuto závěru došli tím způsobem, že infikovali myši monocyty a makrofágy Gram-pozitivními a Gram-negativními kmeny bakterií. Koncentrace cytokinů IL-10, IL-12, IL-18, IFN- α , TNF- α a TGF- β stanovili metodou capture ELISA. Všechny jimi měřené cytokiny s časem zvyšovaly svou koncentraci kromě IL-18. Po 16 hodinách byly hladiny cytokinů vyšší v porovnání s hladinami dosaženými po 8 hodinách. Po aplikaci Gram-pozitivních bakterií došlo k sekreci IL-12 a TNF α , ale ne IL-10, zatímco u Gram-negativních bakterií se zvýšila sekrece IL-12, TNF α a IL-10. Hodnoty IL-12 a TNF α vyvolané Gram-negativními bakteriemi byly v průměru 3x – 5x vyšší než hladiny těchto cytokinů po stimulaci Gram-pozitivními kmeny bakterií.

Apoptóza leukocytů je poměrně hojně studována, a to nejen u mléčné žlázy. V literatuře je možné najít mnoho informací týkajících se apoptózy neutrofilů, zatímco o apoptóze lymfocytů je toho známo výrazně méně. Některé procesy však mohou probíhat obdobně u různých buněk, a proto při studiu apoptózy lymfocytů můžeme vycházet i z poznatků o neutrofilech, případně i o jiných buňkách.

Apoptóza neutrofilů může být oddálena pomocí různých cytokinů. Nejvýznamněji programované buněčné smrti těchto buněk zabraňuje především IL-2, IL-6, IL-8, IL-1 β a IFN- γ (Colotta et al., 1992). Dokáží ji brzdit také některé růstové faktory jako je GM-CSF (Branch et al., 1992), G-CSF (Cox et al., 1992) a NGF (Kanan et al., 1992). V *in vitro* (Colotta et al., 1992), ale také v *in vivo* podmínkách byla prokázána inhibice apoptózy neutrofilů za použití LPS (Yamamoto et al., 1993). Naopak, cytokin TNF- α (Colotta et al., 1992) a IL-10 apoptózu těchto buněk dokáží vyvolat (Cox, 1996). Jedním z biochemických projevů apoptózy je translokace fosfatidylserinu z vnitřní na vnější stranu cytoplazmatické membrány. Tento tzv. *eat-me* signál zachytí receptory fagocytů, které na to reagují produkcí protizánětlivých cytokinů – TGF β a IL-10 (Ravichandran, 2010). V prezentované práci došlo ke zvýšení produkce těchto cytokinů 48 a 72 hodin po stimulaci mléčné žlázy, což navazuje na projevy apoptózy u lymfocytů, které byly zaznamenány nejvíce právě 48 hodin po stimulaci s tím, že apoptóza byla detekována Annexinem V, který prokazuje translokaci fosfatidylserinu. S apoptózou lymfocytů pravděpodobně souvisí také exprese receptoru CD44, který byl v maximu zaznamenán do 48 hodin po stimulaci mléčné žlázy. Byla zjištěna pozitivní korelace mezi apoptózou a expresí CD44 na lymfocytech u obou induktorů (LPS i MDP).

Je známo, že i některé bakterie vyvolávají apoptózu neutrofilů, a to i nepřímo tak, že stimulují neutrofile k produkci IL-8 a TNF- α (Oliveira et al., 1999). Z dosažených výsledků v předkládané práci je patrné, že po 24 a 48 hodinách po aplikaci LPS i MDP byly počty neutrofilů nejvyšší a s časem jejich počet postupně klesal. U lymfocytů byl při použití LPS trend opačný, čili jejich počet postupně s časem narůstal. Induktor MDP zpočátku také vyvolal postupné zvyšování počtu lymfocytů, ale jen do 72 hodinách po aplikaci. Po 168 hodinách došlo k poklesu počtu lymfocytů. V době nejvyššího počtu neutrofilů (tj. 24 a 48 hodin po aplikaci obou induktorů), byla také zaznamenána nejvyšší produkce cytokinu TNF- α . Můžeme se tak domnívat, že v době 24 a 48 hodin po stimulaci mléčné žlázy induktory, kdy počet neutrofilů byl nejvyšší a tím pádem také produkce

TNF- α , byla apoptóza lymfocytů vyvolána právě cytokinem TNF- α , stejně, jako je tomu u neutrofilů. Skutečnost, že jsou neutrofilové mléčné žlázy schopné produkovat TNF- α po stimulaci bakteriálními toxiny (konkrétně LPS) popsali Sohn et al. (2007). Lim et al. (2011) se na základě výsledků své studie, kterou provedli na 17 pacientech s chronickou obstrukční plicní nemocí, domnívají, že zvýšená produkce cytokinu TNF- α má za následek apoptózu lymfocytů. Jiní autoři popsali, že TNF- α vyvolává apoptózu u lymfocytů jak u novorozenců, tak u starších lidí (Aggarwal et al., 1999; Aggarwal et al., 2000; Gupta, 2002). I když Katsikis et al. (1995) ve své studii tvrdí, že TNF žádné zvýšení apoptózy T buněk nevyvolává.

Apoptóza, stejně jako růst a diferenciace buněk, je majoritně řízena cytokiny (Naka et al., 1998). Lenardo et al. (1999) hovoří o dvou hlavních formách apoptózy T buněk, a to řízenou antigeny nebo způsobenou absencí lymfokinů. Obě tyto formy řízené buněčné smrti řídí IL-2 a jeho antigen. Je-li apoptóza řízena antigeny, dochází zároveň k expresi cytokinů FasL a TNF. TGF- β zvyšuje produkci TNF- α pomocí CD4⁺ a CD8⁺ buněk (Gray et al., 2001) a zároveň zrychluje aktivaci vyvolanou buněčnou smrt některých T buněk. TGF- β 1 po aktivaci pomocí anti-CD3 inhibuje apoptózu T buněk (Genestier et al., 1999). Zheng et al. (2002) tvrdí, že zvýšená produkce TGF- β má spojitost se sníženou produkcí IFN- α a IL-10.

Aleksza et al. (2002) zjistili, že u pacientů s kožní dermatitidou CD4⁺ a CD8⁺ T buňky produkují, v porovnání s CD4⁺ a CD8⁺ T buňkami zdravých jedinců, více IL-13 a IL-10, nikoliv však IL-4, což může vyvolat sníženou produkci IFN- γ . Na tomto příkladu můžeme vidět, jak složitá je cytokinová síť v průběhu různých onemocnění. V průběhu zánětu mléčné žlázy bude jistě fungovat spousta podobných zákonitostí a vztahů mezi jednotlivými buňkami a jimi produkovánými cytokiny.

Naka et al. (1998) došli k závěru, že IL-2 nebo IL-4 dokáže nejen redukovat apoptózu thymocytů, ale i samotný počet živých thymocytů zvýšit. Rovněž Veenstra et al. (2008) potrdili spojitost produkce IL-4 s apoptózou T lymfocytů. IL-4, IFN- α a IL-10 regulují expresi Bcl-2 bílkovin v B buňkách chronické lymfocytární leukémie. Je tak usuzováno, že IL-4 zabraňuje spontánní a hydrokortikoidy vyvolané buněčné smrti u B buněk chronické lymfocytární leukémie tím, že zvyšuje hladinu Bcl-2 proteinu (Danescu et al., 1992) nebo také svým blokováním ukončení produkce Bcl-2 proteinu (Panayiotidis et al., 1993). IFN- α chrání B buňky chronické lymfocytární leukémie před apoptózou. Jewell et

al. (1994) objevili, že IFN- α řídí Bcl-2 expresi v B buňkách chronické lymfocytární leukémie a tím je chrání před apoptózou vyvolanou kortikoidy nebo gama zářením. Chaouchi et al. (1994) zase tvrdí, že IFN- α chrání před spontánní apoptózou tyto buňky v *in vivo* prostředí skrze Bcl-2 bílkoviny. Mechanismus Bcl-2 bílkovin zastává klíčovou roli také při vyvolání apoptózy, kdy IL-10 zvyšuje spontánní apoptózu u B buněk chronické lymfocytární leukémie, a to tím, že snižuje obsah Bcl-2 bílkoviny (Fluckiger et al., 1994). Co se týče T buněk, jejich apoptózu dokáže vyvolat např. mnoho HIV-1 bílkovin (Ahr et al., 2004). Ahr et al. (2004) se ve své práci zaměřili na bílkovinou Env (envelope glykoproteins), kdy potvrdili, že tato bílkovina indukuje programovanou buněčnou smrt u lymfocytů v *in vitro* prostředí. Aktivace Fas (CD95) vede k produkci cytokinů nebo také i k indukci apoptózy T buněk. CD4+ a CD8+ T lymfocyty HIV pozitivních pacientů v *in vitro* prostředí podléhají apoptóze více než tyto buňky u kontrolní skupiny (Katsikis et al., 1995).

Do procesu apoptózy konkrétních subtypů lymfocytů zasahují také T_{reg} lymfocyty. Tyto buňky regulují imunitní reakce tak, aby probíhali adekvátním způsobem. Např. při střevním zánětu u myši T_{reg} lymfocyty indukují apoptózu CD4+ efektorových T buněk, a to v *in vitro* i *in vivo* prostředí (Pandiyan et al., 2007).

Gram-pozitivní bakterie *Listeria monocytogenes* způsobuje apoptózu lymfocytů pomocí listeriolysinu O (LLO). Aktivované lymfocyty jsou vůči němu vysoce vnímavé (Carrero et al., 2004). Carrero et al. (2004) zjistili, že myši, u kterých byl deficient I. typu IFN receptoru, byly rezistentnější vůči infekci způsobené bakterií *Listeria monocytogenes* a měli méně apoptotických lézí v porovnání s divokými myšmi. Dále zjistili, že rekombinantní IFN- α zlepšuje odolnost lymfocytů před apoptózou vyvolanou právě pomocí LLO. Autoři usuzují, že typ I IFN je pro bakterie škodlivý a může zvyšovat citlivost lymfocytů vůči apoptóze jako odpovědi na bakteriální toxiny. Argumentují tím, že IFN typ I je, při bakteriální infekci vyvolané výše zmíněnou bakterií, secernován velmi brzy a dochází tak ke zvýšené citlivosti lymfocytů vůči apoptóze.

7 ZÁVĚR

Disertační práce byla zaměřena na studium průběhu zánětlivé odpovědi mléčné žlázy jalovic, a to konkrétně apoptózy lymfocytů, expresi receptoru CD44 na lymfocytech a na analýzu zánětlivých cytokinů TNF- α , IL-4, IL-10 a TGF β 1.

Zánětlivá odpověď byla v mléčné žláze klinicky zdravých jalovic vyvolána pomocí lipopolisacharidu *E. coli* a syntetického derivátu muramyl dipeptidu. Po vyvolání zánětlivé odpovědi byly mléčné žlázy vypláchnuty za 24, 48, 72 a 168 hodin po aplikaci uvedených induktorů. Apoptóza lymfocytů a exprese CD44 byla zjišťována pomocí průtokového cytometru; produkce jmenovaných zánětlivých cytokinů byla analyzována metodou ELISA.

Z celkového počtu buněk získaných z laváží bylo patrné, že v mléčné žláze proběhla zánětlivá odpověď. U diferenciálního počtu buněk byl nejprve zvýšen podíl neutrofilů a v pozdější fázi nastal nárůst podílu lymfocytů. K největšímu výskytu apoptózy došlo 48 hodin po stimulaci mléčné žlázy. Receptor CD44 byl u lymfocytů detekován v největším množství za 24 a 48 hodin po aplikaci induktorů, poté s časem exprese tohoto receptoru na lymfocytech klesala. Koncentrace cytokinu TNF- α byla nejvyšší 24 hodin po stimulaci pomocí LPS. Naopak nejnižších hodnot tohoto cytokinu bylo naměřeno u kontrolní skupiny. Při analýze cytokinu IL-4 byl zjištěn nárůst jeho koncentrace při obou pokusných zásahách (LPS a MDP) do 48 hodin od stimulace zánětlivé odpovědi. Nárůst koncentrace IL-10 byl zaznamenán do 72 hodin od stimulace, a to oběma induktory. Nejvyšší koncentrace TGF- β 1 byly naměřeny při použití induktoru LPS. U kontroly, ale i pokusných zásahů, došlo k nárůstu koncentrace do 48 hodin, poté došlo k jejímu snížení.

Závěrem je, že receptor CD44 má pravděpodobně spojitost s apoptózou lymfocytů, kterou mohou vyvolávat cytokiny použité v této práci.

Z výsledků předkládané práce vyplývá, že je nutný další výzkum v této oblasti, který by mohl být zaměřen na analýzu apoptózy a receptoru CD44 u jednotlivých podskupin lymfocytů (např. T buněk, B buněk, $\gamma\delta$ T lymfocytů); na bádání v oblasti cytokinové sítě a účinků cytokinů na průběh života a smrti buněk mléčné žlázy, popř. na další receptory na lymfocytech a na jejich souvislost se zánětlivou odpovědí mléčné žlázy.

8 POUŽITÁ LITERATURA

AGGARWAL S., GOLLAPUDI S., GUPTA S., 1999: Increased TNF-alpha-induced Apoptosis in Lymphocytes from Aged Humans: Changes in TNF-alpha Receptor Expression and Activation of Caspases. *J Immunol.*, 162(4):2154–2161. ISSN 1550-6606.

AGGARWAL S., GOLLAPUDI S., YEL L., GUPTA A.S., GUPTA S., 2000: TNF-alpha-induced Apoptosis in Neonatal Lymphocytes: TNFRp55 Expression and Downstream Pathways of Apoptosis. *Genes Immun.*, 1(4):271–279. ISSN 1476-5470.

AHR B., ROBERT-HEBMANN V., DEVAUX C., BIARD-PIECHACZYK M., 2004: Apoptosis of Uninfected Cells Induced by HIV Envelope Glycoproteins. *Retrovirology*, 1:12. ISSN 1742-4690.

AKHRASS F.A., ABDALLAH L., BERGER S., HANNA R., REYNOLDS N., THOMPSON S., HALLIT R., SCHLIEVERT P.M., 2013: Streptococcus Agalactiae Toxic Shock-Like Syndrome: Two Case Reports and Review of The Literature. *Medicine (Baltimore)*, 92(1):10–14. ISSN 1536-5964.

ALBERTS B., JOHNSON A., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K., WALTER P., 2002. *Molecular Biology of the Cell* [online]. 4. vyd., New York: Garland Science. ISBN-10: 0-8153-3218-1[vid. 14. 4. 2016]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26846/>

ALEKSZA M., LUKACS A, ANTAL-SZALMAS P., HUNYADI J., SZEGEDI A., 2002: Increased Frequency of Intracellular Interleukin (IL)-13 and IL-10, But Not IL-4, Expressing CD4+ and CD8+ Peripheral T Cells of Patients with Atopic Dermatitis. *Br J Dermatol.*, 147(6):1135–1141. ISSN 1365-2133.

ALIPRANTIS A.O., YANG R.B., MARK M.R, SUGGETT S., DEVAUX B., RADOLF J.D., KLIMPEL G.R, GODOWSKI P., ZYCHLINSKY A., 1999: Cell Activation and Apoptosis by Bacterial Lipoproteins Through Toll-like Receptor-2. *Science*, 285(5428): 736–739. ISSN 1095-9203.

ALSTERGREN P., ZHU B., GLOGAUER M., MAK T.W., ELLEN R.P., SODEK J., 2004: Polarization and Directed Migration of Murine Neutrophils is Dependent on Cell Surface Expression of CD44. *Cell Immunol.*, 231(1-2):146-57. ISSN 0008-8749.

ANAYA-LÓPEZ J.L., CONTRERAS-GUZMÁN O.E., CÁRABEZ-TREJO A., BAIZABAL-AGUIRRE V.M., LÓPEZ-MEZA J.E., VALDEZ-ALARCÓN J.J., OCHOA-ZARZOSA A., 2006: Invasive Potential of Bacterial Isolates Associated with Subclinical Bovine Mastitis. *Res Vet Sci.*, 81(3):358–361. ISSN 0034-5288.

ATREYA R., MUDTER J., FINOTTO .S, MÜLLBERG J., JOSTOCK T., WIRTZ S., SCHÜTZ M., BARTSCH B., HOLTMANN M., BECKER C., STRAND D., CZAJA J., SCHLAAK J.F., LEHR H.A., AUTSCHBACH F., SCHÜRMAN G., NISHIMOTO N., YOSHIZAKI K., ITO H., KISHIMOTO T., GALLE P.R., ROSE-JOHN S., NEURATH M.F., 2000: Blockade of Interleukin 6 Trans Signaling Suppresses T-Cell Resistance Against Apoptosis in Chronic Intestinal Inflammation: Evidence in Crohn Disease and Experimental Colitis *in Vivo*. *Nat Med.*, 6(5): 583–588. ISSN 1078-8956.

BACH E. A., AGUET M., SCHREIBER R. D., 1997: The IFN Gamma Receptor: A Paradigm for Cytokine Receptor Signaling. *Annu. Rev. Immunol.*, 15(1):563-591. ISSN 1545-3278.

BAO Y., LIU X., HAN C., XU S., XIE S., ZHANG Q., GU Y., HOU J., QIAN L., QIAN C., HAN H., XUETAO C., 2014: Identification of IFN- γ -Producing Innate B Cells. *Cell Research*, 24:161–176. ISSN 1001-0602.

BARKEMA H.W., SCHUKKEN Y.H., LAM T.J.G.M., BEIBOER M.L., WILMINK H., BENEDICTUS G., BRAND A., 1998: Incidence of Clinical Mastitis in Dairy Herds Grouped in Three Categories by Bulk Milk Somatic Cell Counts. *J Dairy Sci.*, 81(2):411–419. ISSN 0022-0302.

BARRINGTON R., ZHANG M., FISCHER M., CARROLL M.C., 2001: The Role of Complement in Inflammation and Adaptive Immunity. *Immunol Rev.*, 180(1):5-15. ISSN 0105-2896.

BELARDELLI F., FERRANTINI M., 2002: Cytokines as A Link Between Innate and Adaptive Antitumor Immunity. *Trends Immunol*, 23(4):201–208. ISSN 1471-4906.

BLOWEY R. W., EDMONDSON P., 2010: *Mastitis Control in Dairy Herds*. 2. vyd., London: Farming Press Ltd. 266 s. ISBN 978 085236 314 0.

BLUM J.W., DOSOGENE H., HOEBEN D., VANGROENWEGHE H.M., BRUCKMAIER R.M., BURVENICH C., 2000: Tumor Necrosis Factor- α and Nitrite/Nitrate Responses During Acute Mastitis Induced by *Escherichia Coli* Infection and Endotoxin in Dairy Cows. *Domest Anim Endocrinol.*, 19(4): 2230–2235. ISSN 0739-7240.

BRACH M.A., deVOS S., GRUSS H.J., HERRMANN F., 1992: Prolongation of Survival of Human Polymorphonuclear Neutrophils by Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor is Caused by Inhibition of Programmed Cell Death. *Blood*, 80(11): 2920–2924. ISSN 1528-0020.

BRASSARD D.L., GRACE M.J., BORDENS R.W., 2002: Interferon-A As An Immunotherapeutic Protein. *Journal of Leukocyte Biology*, 71(4):565–581. ISSN 1938-3673.

BUKOWSKI R.M., OLENCKI T., McLAIN D., FINKE J.H., 1994: Pleiotropic Effects of Cytokines: Clinical and Preclinical Studies. *Stem Cells.*, 12 (1):129–140. ISSN 1549-4918.

CAPRON C., LACOUT C., LECLUSE Y., JALBERT V., CHAGRAOUI H., CHARRIER S., GALY A., BENNACEUR-GRISCELLI A., CRAMER-BORDÉ E., VAINCHENKER W., 2010: A Major Role of TGF-Beta1 in The Homing Capacities of Murine Hematopoietic Stem Cell/Progenitors. *Blood.*, 116(8):1244-53. ISSN 1528-0020.

CARNAUD C., LEE D., DONNARS O., PARK S.H., BEAVIS A., KOEZUKA Y., BENDELAC A., 1999: Cutting Edge: Cross-Talk Between Cells of The Innate Immune System: NK T Cells Rapidly Activate NK Cells. *J Immunol.*, 163(9):4647-4650. ISSN 1550-6606.

CARRERO J.A., CALDERON B., UNANUE E.R., 2004: . Listeriolysin O from *Listeria Monocytogenes* is A Lymphocyte Apoptogenic Molecule. *J Immunol.*, 172(8):4866-4874. ISSN 1550-6606.

CARRERO J.A., CALDERON B., UNANUE E.R., 2004: Type I Interferon Sensitizes Lymphocytes to Apoptosis and Reduces Resistance to *Listeria* Infection. *J Exp Med.*, 200(4):535–540. ISSN 1540-9538.

CARRERO J.A., UNANUE E.R., 2006.: Lymphocyte Apoptosis as An Immune Subversion Strategy of Microbial Pathogens. *Trends Immunol.*, 27(11):497-503. ISSN 1471-4906.

CIBULA D., PETRUŽELKA L. (eds.), 2009: *Onkogynekologie*. Český Těšín: Finidr, s. r. o., 614 s. ISBN 978-80-247-2665-6.

COLOTTA F., RE F., POLENTARUTTI N., SOZZANI S., MANTOVANI A., 1992: Modulation of Granulocyte Survival and Programmed Cell Death by Cytokines and Bacterial Products. *Blood*, 80(8): 2012–2020 ISSN 1528-0020.

COUPER K.N., BLOUNT D.G., RILEY E.M., 2008: IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. *J Immunol.*, 180(9): 5771–5777. ISSN 1550-6606.

COX G., 1996: IL-10 Enhances Resolution of Pulmonary Inflammation *In Vivo* by Promoting Apoptosis of Neutrophils. *Am J Physiol.*, 271(4): L566–L571. ISSN 1522-1555.

COX G., GAULDIE J., JORDANA M., 1992: Bronchial Epithelial Cell-derived Cytokines (G-CSF and GM-CSF Promote the Survival of Peripheral Blood Neutrophils *In Vitro*. *Am J Respir Cell Mol Biol.*, 7(5):507–514. ISSN 1535-4989.

CRAVEN N., WILLIAMS M.R., 1985: Defences of The Bovine Mammary Gland Against Infection and Prospects for Their Enhancement. *Vet Immunol Immunopathol.*, 10(1):71–127. ISSN 0165-2427.

CROSS M.L., GANNER A., TEILAB D., FRAY L.M., 2004: Patterns of Cytokine Induction by Gram-Positive and Gram-Negative Probiotic Bacteria. *FEMS Immunol Med Mic*, 42(2):173–180. ISSN 2049-632X.

DAMLE N.K., LEYTZE G., KLUSSMAN K., LEDBETTER J.A., 1993: Activation with Superantigens Induces Programmed Death in Antigen-primed CD4+ Class II+ Major Histocompatibility Complex T Lymphocytes via a CD11a/CD18-Dependent Mechanism. *Eur J Immunol.*, 23(7):1513-1522. ISSN 1521-4141.

DANCESCU M., RUBIO-TRUJILLO M., BIRON G., BRON D., DELESPESE G., SARFATI M., 1992: Interleukin 4 Protects Chronic Lymphocytic Leukemic B Cells from Death by Apoptosis and Upregulates Bcl-2 Expression. *J Exp Med.*, 176(1):1319–1326. ISSN 1540-9538.

DeGRAVES F.J., FETROW J., 1993: Economics of Mastitis and Mastitis Control. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.*, 9(3):421–434. ISSN 0749-0720.

DELOGU G., FAMULARO G., MORETTI S., DE LUCA A., TELLAN G., ANTONUCCI A., MARANDOLA M., SIGNORE L., 2001: Interleukin-10 and Apoptotic Death of Circulating Lymphocytes in Surgical/Anesthesia Trauma. *J Trauma.*, 51(1):92–97. ISSN 1529-8809.

DINARELLO C.A., 2000: Proinflammatory Cytokines. *Chest.*, 118(2):503 –508. ISSN 1931-3543.

DINGES M.M., ORWIN P.M., SCHLIEVERT P.M., 2000: Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev.*, 13(1):16–34. ISSN 1574-6976.

DORWARD D.W., FISCHER E.R., BROOKS D.M., 1997:. Invasion and Cytopathic Killing of Human Lymphocytes by Spirochetes Causing Lyme Disease. Clin Infect Dis., 25(1):S2-S8. ISSN 1537-6591.

DOWTON S.B., COLTEN H.R., 1988: Acute Phase Reactants in Inflammation and Infection. Semin Hematol., 25(2):84-90. ISSN 1532-8686.

DUARTE R., KINDLELAN J.M., CARRACEDO J. , SANCHEZ-GUIJO P., RAMIREZ R., 1997: Mycobacterium Tuberculosis Induces Apoptosis in Gamma/Delta T Lymphocytes from Patients with Advanced Clinical Forms of Active Tuberculosis. Clin Diag Lab Immunol., 4(1):14-18. ISSN 1556-679X.

EASTER M.C., 2003: *Rapid Microbiological Methods in the Pharmaceutical Industry* edited. Boca Raton: CRC Press, 288 s. ISBN 0-203-01087-6.

ELDER K., BAKER D.J., RIBES J.A., 2004: *Infections, Infertility, and Assisted Reproduction*. Cambridge: Cambridge University Press, 392 s. ISBN-13 978-0-521-81910-7.

ENGELKIRK P.G., DUBEN-ENGELKIRK J.L., 2008: *Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases: Essentials of Diagnostic*. Filadelfie: Lippincott Williams & Wilkins, 754 s. ISBN-13: 978-0-7817-9701-6.

FADOK V.A., BRATTON D.L., KONOWAL A., FREED P.W., WESTCOTT J.Y., HENSON P.M., 1998: Macrophages That Have Ingested Apoptotic Cells In Vitro Inhibit Proinflammatory Cytokine Production Through Autocrine/Paracrine Mechanisms Involving TGF-b,PGE2, and PAF. J. Clin. Invest., 101(4): 890–898. ISSN 1558-8238.

FELDMANN M., 2008: Many Cytokines are Very Useful Therapeutic Targets in Disease. *J Clin Invest.*, 118(11):3533–3536. ISSN 1558-8238.

FERENČÍK M., ROVENSKÝ J., SHOENFELD Y., MAŤHA V., 2005: *Imunitní systém: Informace pro každého*. Praha: Grada Publishing, a. s., 236 s. ISBN 80-247-1196-6.

FLUCKIGER A.C., DURAND I., BANCHEREAU J., 1994: Interleukin 10 Induces Apoptotic Cell Death of B Chronic Lymphocytic Leukemia Cells. *J Exp Med.*, 179(1):91–99. ISSN 1540-9538.

GABAY C., KUSHNER I., 1999: Acute-Phase Proteins and Other Systemic Responses to Inflammation. *N Engl J Med.*, 340(6):448-54. ISSN 1533-4406.

GADANI S.P., CRONK J.C., NORRIS, G.T., KIPNIS J., 2012: IL-4 in the Brain: A Cytokine To Remember. *J Immunol.*, 189(9): 4213–4219. ISSN 1550-6606.

GAFFEN S.L., LIU K.D., 2004: Overview of Interleukin-2 Function, Production and Clinical Applications. *Cytokine*, 28(3):109–123. ISSN 1043-4666.

GALY A., TRAVIS M., CEN D., CHEN B., 1995: Human T, B, Natural Killer, and Dendritic Cells Arise from A Common Bone Marrow Progenitor Cell Subset. *Immunity*, 3(4):459–473. ISSN 1074-7613.

GENESTIER L., KASIBHATLA S., BRUNNER T., GREEN D. R., 1999: Transforming Growth Factor Beta1 Inhibits Fas Ligand Expression and Subsequent Activation-Induced Cell Death in T Cells via Downregulation of c-Myc. *J Exp Med.*, 189(2):231–239. ISSN 1540-9538.

GLEESON C., GRAY N., 2002: *The Coliform Index and Waterborne Disease: Problems of microbial drinking water assessment*. Londýn: CRC Press, 208 s. ISSN 0 419 21870 X.

GOODISON S., URQUIDI V., TARIN D., 1999: CD44 Cell Adhesion Molecules. *Mol Pathol.*, 52(4):189-96. ISSN 1472-4154.

GOODYEAR C.S., SILVERMAN G.J., 2003: Death by a B Cell Superantigen: *In Vivo* VH-Targeted Apoptotic Supraclonal B Cell Deletion by A *Staphylococcal* Toxin. *J Exp Med.*, 197(9):1125-39. ISSN 1540-9538.

GORDON J.R., MA Y., CHURCHMAN L., GORDON S.A., DAWICKI W., 2013: Regulatory Dendritic Cells for Immunotherapy in Immunologic Diseases. *Front Immunol.*, 5(7). ISSN 1664-3224.

GRAY J. D., LIU T., HUYNH N., HORWITZ D. A., 2001: Transforming Growth Factor Beta Enhances the Expression of CD154 (CD40L) and Production of Tumor Necrosis Factor Alpha by Human T Lymphocytes. *Immunol.*, 78(2):83–88. ISSN 0165-2478.

GUPTA S., 2002: Tumor Necrosis Factor-alpha-induced Apoptosis in T Cells from Aged Humans: A Role of TNFR-I and Downstream sSignaling Molecules. *Exp Gerontol.*, 37(2-3):293–299. ISSN 1873-6815.

HARMON R.J., 1994: Physiology of Mastitis and Factors Affecting Somatic Cell Counts. *J Dairy Sci.*, 77(7):2103–2112. ISSN 0022-0302.

HART S.P., DOUGHERTY G.J., HASLETT C., DRANSFIELD I., 1997: CD44 Regulates Phagocytosis of Apoptotic Neutrophil Granulocytes, but Not Apoptotic Lymphocytes, by Human Macrophages. *J Immunol.*, 159(2):919-25. ISSN 1550-6606.

HESSLE C., ANDERSSON B., WOLD A.E., 2000: Gram-Positive Bacteria are Potent Inducers of Monocytic Interleukin-12 (IL-12) While Gram-Negative Bacteria Preferentially Stimulate IL-10 Production. *Infect Immun.*, 68(6): 3581–3586. ISSN 1098-5522.

HISAEDA K., HAGIWARA K., EGUCHI J., YAMANAKA H., KIRISAWA R., IWAI H., 2001: Interferon-Gamma and Tumor Necrosis Factor-Alpha levels in Sera and Whey of Cattle with Naturally Occurring Coliform Mastitis. *J Vet Med Sci.*, 63 (1):1009–1011. ISSN 1347-7439.

HONEYMAN A., FRIEDMAN H., BENDINELLI M., 2006: *Staphylococcus aureus Infection and Disease*. New York: Springer Science & Business Media, 330 s. ISBN 0-306-46591-4.

HURLEY L.W., THEIL P.K., 2011: Perspectives on Immunoglobulins in Colostrum and Milk. *Nutrients.*, 3(4): 442–474. ISSN 2072-6643.

HUXLEY J.N., GREEN M.J., GREEN L.E., BRADLEY A.J., 2002: Evaluation of the Efficacy of an Internal Teat Sealer During the Dry Period. *J Dairy Sci.*, 85(3):551 –561. ISSN 1525-3198.

CHAOUCHI N., WALLON C., TAIEB J., AUFFREDOU M.T., TERTIAN G., LEMOINE F.M., DELFRAISSY J.F., VAZQUEZ A., 1994: Interferon- α -Mediated

Prevention of *in Vitro* Apoptosis of Chronic Lymphocytic Leukemia B Cells: Role of bcl-2 and c-myc. *Clin Immunol.*, 73(2):197–204. ISSN 2141-2219.

CHIN D.A., 2012: *Water-Quality Engineering in Natural Systems: Fate and Transport Processes in the Water Environment*. 2. vyd. New York: John Wiley & Sons 472 s. ISBN 978-1-118-07860-0.

ISHIKAWA H., SHIRAHATA T., HASEGAWA K., 1994: Interferon-Gamma Production of Mitogen Stimulated Peripheral Lymphocytes in Perinatal Cows. *J Vet Med Sci.*, 56(4):735 –738. ISSN 1347-7439.

JEWELL A.P., WORMAN C.P., LYDYARD P.M., YONG K.L., GILES F.J., GOLDSTONE A.H., 1994: Interferon-alpha Up-regulates bcl-2 Expression and Protects B-CLL Cells from Apoptosis *in Vitro* and *in Vivo*. *Br J Haematol.*, 88(2):268–274. ISSN 1365-2141.

JEWETT A., BONAVIDA B., 1995: Interferon-Alpha Activates Cytotoxic Function but Inhibits Interleukin-2-Mediated Proliferation and Tumor Necrosis Factor-Alpha Secretion by Immature Human Natural Killer Cells. *J Clin Immunol.*, 15(1):35–44. ISSN 1573-2592.

JÍLEK P., 2014: *Imunologie: stručně, jasně, přehledně*. 4. vyd. Praha: Grada Publishing, a. s., 96 s. ISBN 978-80-247-4822-1.

JONAS D., WALEV I., BERGER T., LIEBETRAU M., PALMER M., BHAKDI S., 1994: Novel Path to Apoptosis: Small Transmembrane Pores Created by *Staphylococcal* Alpha-Toxin in T Lymphocytes Evoke Internucleosomal DNA Degradation. *Infect Immun.*, 62(4):1304-1312. ISSN 1098-5522.

KANNAN Y., USAMI K., OKADA M., SHIMIZU S., MATSUDA H., 1992: Nerve Growth Factor Suppresses Apoptosis Of Murine Neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun.*, 186(2):1050–1056. ISSN 0006-291X.

KATSIKIS P.D., WUNDERLICH E.S., SMITH C.A., HERZENBERG L.A., HERZENBERG L.A., 1995: Fas Antigen Stimulation Induces Marked Apoptosis of T Lymphocytes in Human Immunodeficiency Virus-Infected Individuals. *J Exp Med.*, 181(6):2029–2036. ISSN 1540-9538.

KENNY K., REISER R.F., BASTIDA-CORCUERA F.D., NORCROSS N.L., 1993: Production of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin by bovine mammary isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.*, 31(3): 706–707. ISSN 1098-660X.

KITTNAR O. (ed.), 2011: *Lékařská fyziologie*. Praha: Grada Publishing, spol. s r. o., 790 s. ISBN 978-80-247-3068-4.

KITTRICH, D., 2001, "Kim32." ver. 5.15, www.ok.cz/dkitt

KONTSEKOVÁ E., KONTSEK P., 2004: *Základy imunologie*. Bratislava: Univerzita Komenského, 217 s. ISBN 80-223-1828-0.

KOPECKÝ J. (ed.), 1981: *Chov skotu*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 504 s.

KOUDELKOVÁ M., SOBEK O., KELBICH P., ADAM P., MELEZINKOVÁ V., VESELÁ, HAJDUKOVÁ L., ADAM D., 2010: Vyšetření cytokinů v likvoru. In: Roche

Diagnostic.cz [online]. Hoffmann-La Roche Ltd [vid. 2016_04_05]. Dostupné z: <http://roche-diagnostics.cz/LaborAktuell/LA2010/Documents/LA0110/Likvor.pdf>

KOZÁK T., 2015: *Imunitní trombocytopenie*. Praha: Maxdorf, 135 s. ISBN 978-80-7345-370-1.

LAMKA, J., DUCHÁČEK L., 2014: *Veterinární vademecum pro farmaceuty*. Praha: Karolinum Press, 128 s. ISBN 978-80-246-2792-2.

LANCELOTTI M., BROCCHI M., DIAS Da SILVEIRA W., 2006: Bacteria-Induced Apoptosis: An Approach To Bacterial Pathogenesis. *Braz. J. morphol. Sci.*, 23(1):75–86. ISSN 1677-3225.

LANGROVÁ T., SLÁDEK Z., RYŠÁNEK D., 2008: Expression of CD14 and CD44 on Bovine Polymorphonuclear Leukocytes During Resolution of Mammary Inflammatory Response Induced by Muramyldipeptide and Lipopolysaccharide. *Vet Med Czech.*, 53(1):1-11. ISSN 1805-9392.

LAWRENCE E., 2005: *Henderson's Dictionary of Biology*. 13. vyd. Londýn: Pearsoned, 748 s. ISBN-10: 0-13-127384-1.

LENARDO M., CHAN F.K.M., HORNING F., MCFARLAND H., SIEGEL R., WANG J., ZHENG L., 1999: MATURE T LYMPHOCYTE APOPTOSIS—Immune Regulation in a Dynamic and Unpredictable Antigenic Environment. *Annu Rev Immunol* 17(1): 221–253. ISSN 0732-0582.

LIM S.C., JU J.Y., CHI S.Y., BAN J.H., KWON Y.S., OH I.J., KIM K.S., KIM Y.I., KIM Y.C., 2011: Apoptosis of T Lymphocytes Isolated from Peripheral Blood of Patients

with Acute Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Yonsei Med J.*, 52(4):581–587. ISSN 1976-2437.

LUAN B., FENG M.J., QIAO J.Y., 2012: Effects Of Bacterial Lipopolysaccharide On Serum IL-4, Serum IL-8 And Pulmonary VEGF Expression In Mice With Asthma. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*, 14(4):297–300. ISSN 1008-8830.

LÜLLMANN-RAUCH R. 2012: *Histologie*. 3. vyd. Praha: Grada Publishing, a. s., 556 s. ISBN 978-80-247-3729-4.

MAĐAR R., PODSTATOVÁ R., ŘEHOŘOVÁ J., 2006: *Prevence nozokomiálních nákaz v klinické praxi*. Praha: Grada Publishing, a. s., 178 s. ISBN 80-247-1673-9.

MACH J.P., PAHUD J.J., 1971: Secretory IgA, A Major Immunoglobulin in Most Bovine External Secretions. *J Immunol.*, 106(2):552-563. ISSN 1550-6606.

MALHOTRA A., SHANKER A., 2011: NK Cells: Immune Cross-Talk and Therapeutic Implications. *Immunotherapy*, 3(10): 1143–1166. ISSN 1750-7448.

MARKEY B., LEONARD F., ARCHAMBAULT M., CULLINANE A., MAGUIRE D., 2013: *Clinical Veterinary Microbiology*. 2. vyd. Elsevier, 656 s. ISBN 9780723432371.

MARTÍNKOVÁ J. (ed.), 2005: *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*. Praha: Grada Publishing a. s., 379 s. ISBN 978-80-247-1356-4.

MARVAN F. (ed.), 2007: *Morfologie a fyziologie hospodářských zvířat*. 4. vyd. Praha: Brázda, 304 s. ISBN 978-80-213-1658-4.

MERLE N.S., NOE R., HALBWACHS-MECARELLI L., FREMEAUX-BACCHI V., ROUMENINA L.T., 2015: Complement System Part II: Role in Immunity. *Front Immunol.*, 6(257). ISSN 1664-3224.

MERRICK J.C., EDELSON B. T., BHARDWAJ V., SWANSON P. E., UNANUE E. R., 1997: Lymphocyte Apoptosis During Early Phase of *Listeria* Infection in Mice. *Am J Pathol.*, 151(3): 785–792. ISSN 0002-9440.

NAKA T., MATSUMOTO T., NARAZAKI M., FUJIMOTO M., MORITA Y., OHSAWA Y. , SAITO H., NAGASAWA T., UCHIYAMA Y. , KISHIMOTO T., 1998: Accelerated Apoptosis of Lymphocytes by Augmented Induction of Bax in SSI-1 (STAT-Induced STAT Inhibitor-1) Deficient Mice. *Immunology*, 95(1):15577–15582. ISSN 1365-2567.

NAOR D., SIONOV R.V., ISH-SHALOM D., 1997:. CD44: Structure, Function, and Association with The Malignant Process. *Adv Cancer Res.*, 71:241-319. ISSN 0065-230X.

NELMS M., SUCHER K.P., LACEY K., ROTH S.L., 2007: *Nutrition Therapy and Pathophysiology*. Boston: Cengage Learning, 1232 s. ISBN-10: 1439049629.

NOUZA K., 1999: „Aktivované“ CD44: znak aktivity autoimunitního onemocnění. In: *Medicína* [online]. Odborné fórum lékařů a farmaceutů.[vid. 2016_04_01]. Dostupné z: http://www.zdrava-rodina.cz/med/med299/med299_44.html

OHBA M., SHIBANUMA M., KUROKI T., NOSE K., 1994: Production of Hydrogen Peroxide by Transforming Growth Factor-Beta 1 and Its Involvement in Induction of Egr-1 in Mouse Osteoblastic Cells. *J Cell Biol.*, 126(4):1079-88. ISSN 1540-8140.

OHTSUKA H., TERASAWA S., WATANABE C., KOHIRUIMAKI M., MUKAI M., ANDO T., PETROVSKI K.R., MORRIS S., 2010: Effect of Parity on Lymphocytes in Peripheral Blood and Colostrum of Healthy Holstein Dairy Cows. *Can J Vet Res.*, 74(2):130–135. ISSN 0830-9000.

OLIVEIRA R.B., MORAES M.O., OLIVEIRA E.B., SARNO E.N., NERY J.A.C., SAMPAIO E.P., 1999: Neutrophils Isolated from Leprosy Patients Release TNF-Alpha and Exhibit Accelerated Apoptosis *in Vitro*. *J Leukoc Biol.*, 65(1):364–371. ISSN 0741-5400.

OPAL S.M., DePALO V.A., 2000: Anti-Inflammatory Cytokines. Impact of Basic Research on Tomorrow's Medicine, 117(4):1162–1172. ISSN 1061-4036.

PADUCH J.H., KRÖMKER V., 2011: Colonization of The Teat Skin and The Teat Canal of Lactating Dairy Cattle by Mastitis Pathogens. *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere*, 39(2):71–76. ISSN 1434-1220.

PANAYIOTIDIS P., GANESHAGURU K., JABBAR S.A., HOFFBRAND A.V., 1993: Interleukin-4 Inhibits Apoptotic Cell Death and Loss of the Bcl-2 Protein in B-chronic Lymphocytic Leukaemia Cells *in Vitro*. *Br J Haematol.*, 85(3):439–445. ISSN 1365-2141.

PANCZAK, A., OTOVÁ, B., 2014: *Lékařská biologie a genetika (III. díl)*. Praha: Karolinum Press, 146 s. ISBN 9788024624150.

PANDIYAN P., ZHENG L., ISHIHARA S., REED1 J., LENARDO M.J., 2007: CD4+CD25+Foxp3+ Regulatory T Cells Induce Cytokine Deprivation-Mediated Apoptosis of Effector CD4+ T Cells. *Nat Immunol.*, 8(12):1353–1362. ISSN 1529-2908.

PARK Y.W., HAENLEIN G.F.W., 2006: *Handbook of Milk of Non-Bovine Mammals*. New York: Wiley & Sons 449 s. ISBN-13:978-0-8138-2051-4.

PATTERSON M.J., 1996. Streptococcus. In: BARON S., *Medical Microbiology* [online]. 4.vyd., University of Texas Medical Branch at Galveston. ISBN-10: 0-9631172-1-1. [vid. 15. 4. 2016]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7611/>

PERALTA-ZARAGOZA O., LAGUNAS-MARTINEZ A., MADRID-MARINA V., 2001: Transforming Growth Factor Beta-1: Structure, Function, and Regulation Mechanisms in Cancer. *Salud Publica Mex.*, 43(4):340-51. ISSN 1606-7916.

PERTICARARI S., PRESANI G., PRODAN M., GRANZOTTO M., MURGIA R., CINCO M., 2003: Lymphocyte Apoptosis Co-Cultured with *Borrelia Burgdorferi*. *Microb Pathog.*, 35(4):139-145. ISSN 0882-4010.

PETREY A.C., de la MOTTE C.A., 2014: Hyaluronan, a Crucial Regulator of Inflammation, *Front Immunol.*, 5:101. ISSN 1664-3224.

PONTA H., SLEEMAN J. DALL P., MOLL J., SHERMAN L., HERRLICH P., 1994: CD44 Isoforms in Metastatic Cancer. *Invasion Metastasis*, 14(1-6):82–86. ISSN 1423-0119.

PONTZER C.H., BAZER F.W., JOHNSON H.M., 1991: Antiproliferative Activity of A Pregnancy Recognition Hormone, Ovine Trophoblast Protein-1. *Cancer Res.*, 51(19):5304–5307. ISSN 1538-7445.

RAVICHANDRAN K.S., 2010: Find-Me and Eat-Me Signals in Apoptotic Cell Clearance: Progress And Conundrums. *J Exp. Med.*, 207(9): 1807–1817 ISSN: 1540-9538.

REECE W. O., 2011: *Fyziologie a funkční anatomie domácích zvířat*. Praha: Grada Publishing, spol. s. r. o., 473 s. ISBN 978-80-247-3282-4.

ROVENSKÝ J. (ed.), 2006: *Revmatologický výkladový slovník*. Praha: Grada Publishing, a. s., 275 s. ISBN 80-247-1614-3.

SABAPATHY T.K., HWANG L.A., HUI K.M., 1994: Differential Effect of *Staphylococcal* Enterotoxin B upon The Induction of Tolerance on Peripheral CD4+V Beta 8+ and CD8+V Beta 8+ T Cells. *Cell Immunol.*, 158 (1):83–95. ISSN 1090-2163.

SABAT R., 2010: IL-10 Family of Cytokines. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 21(5):315–324. ISSN 1359-6101.

SABAT R., GRÜTZ G., WARSZAWSKAA K., KIRSCHA S., WITTEA E., WOLK K., GEGINAT J., 2010: Biology of Interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 21(5): 331–344. ISSN 1359-6101.

SAVILL J.S., WYLLIE A.H., HENSON J.E., WALPORT M.J., HENSON P.M., HASLETT C., 1989: Macrophage Phagocytosis of Aging Neutrophils in Inflammation. Programmed Cell Death in The Neutrophil Leads to Its Recognition by Macrophages. *J Clin Invest.*, 83(3): 865–875. ISSN 1558-8238.

SELTMANN G., HOLST O., 2013: *The Bacterial Cell Wall*. New York: Springer Science & Business Media, 280 s. ISBN 978-3-642-07648-0.

SERHAN C.N., WARD P.A., GILROY D.W., 2010: *Fundamentals of Inflammation*. Cambridge: Cambridge University Press, 473 s. ISBN 978-0-521-88729-8.

SHAMAY A., SHAPIRO F., LEITNER G., SILANIKOVE N., 2003: Infusions of Casein Hydrolyzates into the Mammary Gland Disrupt Tight Junction Integrity and Induce Involution in Cows. *J Dairy Sci.*, 86(4):1250–1258. ISSN 0022-0302.

SCHOOK L.B., TUMBLESON M.E., 1997: *Advances in Swine in Biomedical Research*. New York: Springer Science & Business Media. 422 s. ISBN 0-306-45495-5.

SCHRODER K., HERTZOG P.J., RAVASI T., HUME D.A., 2004: Interferon- γ : an Overview of Signals, Mechanisms and Functions. *Journal of Leukocyte Biology*, 75(2):163–189. ISSN 1938-3673.

SIMS K. D., BARTON T. D., 2006: Group B Streptococcal Toxic Shock Syndrome in An Asplenic Patient: Case Report and Literature Review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, 25(3):208–210. ISSN 1435-4373.

SING A., ROST D., TVARDOVSKAIA N., ROGGENKAMP A., WIEDEMANN A., KIRSCHNING C.J., AEPFELBACHER M., HEESEMANN J., 2002: Yersinia V-Antigen Exploits Toll-Like Receptor 2 and CD14 for Interleukin 10-Mediated Immunosuppression. *J Exp Med.*, 196(8):1017–1024. ISSN 1540-9538.

SIPKA A., GURJAR A., KLAESSIG S., DUHAMEL G.E., SKIDMORE A., SWINKELS J., COX P., SCHUKKEN Y., 2013: Prednisolone and Cefapirin Act Synergistically in Resolving experimental *Escherichia Coli* Mastitis. *J Dairy Sci.*, 96(1):4406–4418. ISSN 0022-0302.

SLÁDEK Z., RYŠÁNEK D., 2009: Expression of Macrophage CD44 Receptor in The Course of Experimental Inflammatory Response of Bovine Mammary Gland Induced by Lipopolysaccharide and Muramyl Dipeptide. *Res Vet Sci.*, 86(1):235-240. ISSN 0034-5288.

SLÁMA P., SLÁDEK Z., RYŠÁNEK D., 2009a: Effect of Muramyl Dipeptide on Apoptosis of Bovine Mammary Gland Lymphocytes in Vitro. *Slovak J. Anim. Sci.*, 42(1):90-93. ISSN 1337-9984.

SLÁMA P., SLÁDEK Z., RYŠÁNEK D., 2009b: Lipopolysaccharide Delays Apoptosis of Bovine Lymphocytes. *FEBS J.*, 276:223.

SLÁMA P., SLÁDEK Z., RYŠÁNEK D., LANGROVÁ T., 2009c: Effect of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus uberis* on Apoptosis of Bovine Mammary Gland Lymphocytes. *Res Vet Sci.*, 87(2):233-238. ISSN 0034-5288.

SLANINA Ľ., SOKOL J. (eds.), 1991: *Vademecum veterinárneho lekára*. Bratislava: Príroda, 1182 s. ISBN 80-07-00419-X.

SNEATH R.J., MANGHAM D.C., 1998: The Normal Structure and Function of CD44 and Its Role in Neoplasia. *Mol Pathol.*, 51(4): 191–200. ISSN 1472-4154.

SOHN E.J., PAAPE M.J., CONNOR E.E., BANNERMAN D.D., FETTERER R.H., PETERS R.R., 2007: Bacterial Lipopolysaccharide Stimulates Bovine Neutrophil Production of TNF- α , IL-1 β , IL-12 and IFN- γ . *Vet Res.*, 38(1): 809–818. ISSN 1297-9716.

SORDILLO L.M., SHAFER-WEAVER K., DEROSA D., 1997: Immunobiology of The Mammary Gland. *J Dairy Sci.*, 80(8):1851–1865. ISSN 0022-0302.

SRIVASTAVA S., 2013: *Understanding Bacteria*. New York: Springer Science & Business Media, 469 s. ISBN 978-90-481-6429-5.

StatSoft, I., 2007, "STATISTICA (data analysis software system)." ver. 8.0, www.statistica.com

STEINKE J.W., BORISH L., 2001: Th2 Cytokines and Asthma - Interleukin-4: Its Role in The Pathogenesis of Asthma, and Targeting It for Asthma Treatment with Interleukin-4 Receptor Antagonists. *Respir Res.*, 2(2):66–70. ISSN 1465-993X.

STEVENS P.K., CZUPRYNSKI C.J., 1996: Pasteurella Haemolytica Leukotoxin Induces Bovine Leukocytes to Undergo Morphologic Changes Consistent with Apoptosis *in Vitro*. *Infect Immun.*, 64(7):2687-2694. ISSN 1098-5522.

TATUM F.M., BRIGGS R.E., SREEVATSAN S.S., ZEHR E.S., LING HSUAN S., WHITELEY L.O., AMES T.R., MAHESWARAN S.K., 1998: Construction of An Isogenic Leukotoxin Deletion Mutant of Pasteurella Haemolytica Serotype 1: Characterization And Virulence. *Microb Pathog.*, 24(1):37-46. ISSN 0882-4010.

TECCHIO C., MICHELETTI A., CASSATELLA M.A., 2014: Neutrophil-Derived Cytokines: Facts Beyond Expression. *Front Immunol.*, 5:508. ISSN 1664-3224.

TERUNUMA H., DENG X., DEWAN Z., FUJIMOTO S., YAMAMOTO N., 2008: Potential Role of NK Cells in The Induction of Immune Responses: Implications for NK Cell-Based Immunotherapy for Cancers and Viral Infections. *Int Rev Immunol.*, 27(3):93-110. ISSN 1563-5244.

TODAR K., 2012: Immune Defense against Bacterial Pathogens: Innate Immunity. In Todar's Online Textbook of Bacteriology[online]. University of Wisconsin[vid. 2016_04_10]. Dostupné z: <http://textbookofbacteriology.net/>

TOMAN M. (ed.), 2000: *Veterinární imunologie*. Praha: Grada Publishing, spol. s. r. o., 413 s. ISBN 80-7169-727-3.

TROJAN S. (ed.), 2003: *Lékařská fyziologie*. 4. vyd. Praha: Grada Publishing, a. s. 771 s. ISBN 80-247-0512-5.

TROTTER J., 2000: WinMDI Version 2.8. <http://facs.scripps.edu/>.

VACHON E., MARTIN R., PLUMB J., KWOK V., VANDIVIER R.W., GLOGAUER M., KAPUS A., WANG X., CHOW C.W., GRINSTEIN S., DOWNEY G.P., 2006: CD44 Is a Phagocytic Receptor. *Blood.*, 107(10):4149-58. ISSN 1528-0020.

VAN OOSTVELDT K., DOSOGNE H., BURVENICH C., PAAPE M. J., BROCHEZ V., VAN DEN EECKHOUT, E., 1999: Flow Cytometric Procedure to Detect Apoptosis of Bovine Polymorphonuclear Leukocytes in Blood. *Vet Immunol Immunopathol*, 70(1): 125-133. ISSN 0165-2427.

VASANTHAKUMARI R., 2007: *Textbook of Microbiology*. Nové Dillí: BI Publications Pvt Ltd, 524 s. ISBN-10:81-7225-234-X.

VEENSTRA H., BAUMANN R., LUKEY P.T., BEYERS N., VAN HELDEN P.D., WALZL G., 2008: High Levels of Intracellular IL-4 are Expressed in Circulating Apoptotic T Cells in Patients with Tuberculosis and in Community Controls. *Tuberculosis (Edinb)*, 88(1):21–30. ISSN 1873-281X.

VERMES I., HAANEN C., STEFFENS-NAKKEN H., REUTELINGSPERGER C., 1995: A Novel Assay for Apoptosis. Flow Cytometric Detection of Phosphatidylserine Expression on Early Apoptotic Cells Using Fluorescein Labelled Annexin V. *J Immunol Methods*, 184(1): 39-51. ISSN 0022-1759.

VILCEK J., FELDMANN M., 2004: Historical Review: Cytokines As Therapeutics and Targets of Therapeutics. *Trends Pharmacol Sci.*, 25(4):201-9. ISSN 0165-6147.

VORBACH C., CAPECCHI M.R., PENNINGER J.M., 2006: Evolution of The Mammary Gland from The Innate Immune System? *BioEssays*, 28(6):606–616. ISSN 1521-1878.

WEBB S.R., GASCOIGNE N.R., 1994: T-Cell Activation by Superantigens. *Curr Opin Immunol.*, 6(3):467-475. ISSN 0952-7915.

WEINBERG J.M., BUCHHOLZ R., 2006: *TNF-alpha Inhibitors* edited. Basel: Birkhäuser Verlag, 133 s. ISBN-10:3-7643-7248-6.

YAMAMOTO C., YOSHIDA S., TANIGUCHI H., QIN M.H., MIYAMOTO H., MIZUGUCHI Y., 1993: Lipopolysaccharide and Granulocyte Colony-Stimulating Factor Delay Neutrophil Apoptosis and Ingestion by Guinea Pig Macrophages. *Infect Immun.*, 61(5):1972–1979. ISSN 1098-5522.

YOKOMIZO Y., MORI Y., SHIMOJI Y., SHIMIZU S., SENTSU H., KODAMA M., IGARASHI H., 1995: Proliferative Response Andcytokine Production Of Bovine Peripheral Blood Mononuclear Cellsinduced By The Superantigens Staphylococcal Enterotoxins And Toxicshock Syndrome Toxin-1. *J Vet Med Sci.*, 57(2): 299–305. ISSN 1347-7439.

YOSHIO H., LAGERCRANTZ H., GUDMUNDSSON G.H., AGERBETH B., 2004: First Line of Defense in Early Human Life. *Seminars in Perinatology*, 28(4):304–311. ISSN 1084-2756.

ZAMORANO J., RIVAS M.D., PÉREZ-G. M., 2003: Interleukin-4: A Multifunctional Cytokine. *Inmologia*, 22(2):215–224. ISSN 0213-9626.

ZHANG J.M., AN J., 2007: Cytokines, Inflammation and Pain. *Int Anesthesiol Clin.*, 42(2):27–37. ISSN 1537-1913.

ZHENG S.G., GRAY J.D., OHTSUKA K., YAMAGIWA S., HORWITZ D.A., 2002: Generation Ex Vivo of TGF-Beta-Producing Regulatory T Cells from CD4+CD25- Precursors. *J Immunol.*, 169(8):4183–4189. ISSN_1550-6606.

ŽIVNÁ H., ŽIVNÝ P., 2004: Klasifikace cytokinů. In: *Encyklopedie laboratorní medicíny pro klinickou praxi* [online]. SEKK [vid. 2016_04_01]. Dostupné z: <http://www.enclabmed.cz/encyklopedie/B/ZPAAI.htm>