

MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ

AGRONOMICKÁ FAKULTA

BAKALÁRSKA PRÁCA

BRNO 2015

Andrej Bátik

Mendelova univerzita v Brně

Agronomická fakulta

Ústav morfologie, fyziologie a genetiky zvířat



**Apoptóza mononukleárných buniek a makrofágov
mliečnej žľazy hovädzieho dobytká**

Bakalárska práca

Vedúci práce:

prof. MVDr. Zbyšek Sládek, Ph.D.

Vypracoval:

Andrej Bátik

Brno 2015

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som prácu: Apoptóza mononukleárných buniek a makrofágov v mliečnej žľaze hovädzieho dobytku vypracoval samostatne a všetky použité pramene a informácie uvádzam v zozname použitej literatúry. Súhlasím, aby moja práca bola zverejnená v súlade s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách v znení neskorších predpisov a v súlade s platnou *Smernicou o zverejňovaní vysokoškolských záverečných prác.*

Som si vedomý, že se na moju prácu vzťahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavrenie licenčnej zmluvy a použitie tejto práce ako školského diela podľa § 60 odst. 1 autorského zákona.

Ďalej sa zaväzujem, že pred spísaním licenčnej zmluvy o použití diela inou osobou (subjektom) si vyžiadam písomné stanovisko univerzity, že predmetná licenčná zmluva nie je v rozpore s oprávnenými záujmami univerzity, a zaväzujem sa uhradiť prípadný príspevok na úhradu nákladov spojených so vznikom diela, a to až do ich skutočnej výšky.

V Brně dňa:.....

POĎAKOVANIE:

Moje poďakovanie patrí najmä vedúcemu práce prof. MVDr. Zbyškovi Sládkovi PhD. za jeho cenné rady a pripomienky, ďalej chcem poďakovať Ing. Tereze Šustrovej za jej ochotu a trpezlivosť pri konzultáciách a za jej cenné rady.

ABSTRAKT:

Táto bakalárska práca je zameraná na apoptózu mononukleárných buniek a makrofágov mliečnej žľazy hovädzieho dobytku. V prvej časti sú opísané mononukleárne bunky. Monocyty sa rýchlo dostávajú z krvi do tkanív a diferencujú sa na makrofágy. Makrofágy sú profesionálne fagocyty. Ich význam spočíva v imunitnej odpovedi organizmu. Reagujú na antigény a svojou činnosťou sa snažia odstrániť zdroj tohto antigénu. Taktiež odstraňujú staré a nepotrebné bunky. Ďalšia časť je zameraná na apoptózu. Opisuje mechanizmus jej biochemických, morfológických a genetických procesov. Apoptóza je prirodzená a nevyhnutná, bez nej nemôže život existovať. Mliečna žľaza hovädzieho dobytku je často infikovaná baktériami, čo spôsobuje zápalové ochorenie známe ako mastitída. Mastitída je závažný klinický a subklinický stav, ktorým môžu kravy trpieť, taktiež spôsobuje nemalé ekonomické straty. Táto bakalárska práca popisuje procesy apoptózy mononukleárných buniek a makrofágov, ktoré prebiehajú v mliečnej žľaze hovädzieho dobytku za účelom lepšieho pochopenia priebehu choroby a jej úspešného liečenia.

KLÚČOVÉ SLOVÁ:

apoptóza, mononukleárne bunky, monocyt, makrofág, mliečna žľaza hovädzieho dobytku

ABSTRACT:

This bachelor thesis is aimed on apoptosis of mononuclear cells and macrophages in bovine mammary gland. The first part is about mononuclear cells. Monocytes can quickly migrate from blood to tissue and differentiate to macrophages. Macrophages are professional phagocytes. They have significant role in immunity respond. These cells react on every antigen and they remove source of this antigen and also remove old and unuseful cells. Next part is about apoptosis. Apoptosis as known as prograded cell death. In this part is described morphology, biochemistry and genetics of prograded cell death. Apoptosis is completely natural way of dying, without it live cannot exist. Bovine mammary gland is often attacked by staphylococcus and other bacteria. Result of these attacks is in most cases mastitis, inflammatory disease. Mastitis causes serious health danger for cows also causes economical and finance lost in dairy farms. Thesis describes understanding of these processes in order to improve knowledge and battle against inflammatory diseases.

KEY WORDS:

apoptosis, mononuclear cells, monocyte, macrophage, bovine mammary gland

OBSAH:

1	ÚVOD	- 8 -
2	LITERÁRNY PREHĽAD	- 9 -
2.1	MONONUKLEÁRNE BUNKY	- 9 -
2.1.1	<i>Krvné monocyty</i>	- 9 -
2.1.2	<i>Makrofágy</i>	- 12 -
2.2	APOPTÓZA	- 14 -
2.2.1	<i>Biochemické procesy bunke počas apoptózy</i>	- 15 -
2.2.2	<i>Signalizačná dráha apoptózy</i>	- 16 -
2.2.3	<i>Morfologické zmeny bunkových organel počas apoptózy</i>	- 19 -
2.2.4	<i>Gény zapojené do apoptózy</i>	- 19 -
2.3	APOPTÓZA MAKROFÁGOV A MONOCYTOV	- 21 -
2.3.1	<i>Pro-apoptická regulácia</i>	- 22 -
2.3.2	<i>Anti apoptická regulácia</i>	- 24 -
2.4	APOPTÓZA MAKROFÁGOV MLIEČNEJ ŽĽAZY	- 25 -
2.4.1	<i>CD14 expresia v apoptotických bunkách</i>	- 27 -
2.4.1	<i>Metodika získavania makrofágov mliečnej žľazy hovädzieho dobytku</i>	- 28 -
3	ZÁVER	- 32 -
4	ZOZNAM OBRÁZKOV	- 33 -
5	PREHĽAD POUŽITEJ LITERATÚRY	- 34 -
6	ZOZNAM SKRATIEK	- 43 -

1 ÚVOD

Apoptóza (z gréc. *apoptosis* – padanie) alebo prirodzená bunková smrť, je dôležitý a nevyhnutný proces, pri ktorom dochádza k odstráneniu nepotrebných či starých buniek. Ide o zánik buniek bez negatívneho efektu na okolité prostredie. Je to prísne regulovaný mechanizmus, pri ktorom prebiehajú charakteristické biochemické a morfológické procesy. Apoptóza hrá významnú rolu v imunitnej reakcii organizmu.

Mononukleárne bunky sú dôležitou súčasťou nešpecifickej imunity. Monocyty majú schopnosť prestúpiť z krvi do tkanív a diferencovať sa na makrofágy. Makrofágy majú schopnosť fagocytózy. Fagocytovaný materiál na jednej strane môže byť užitočným zdrojom stavebných komponentov, na druhej strane v mnohých prípadoch predstavuje hrozbu, ktorú je nutné zabezpečiť tak, aby neohrozovala organizmus. Preto tieto bunky, často podliehajú apoptóze, kde na rozdiel od nekrózy nedochádza k vylúčeniu bunkového obsahu do okolia. Všetok bunkový obsah je bezpečne “zabalený“ do apoptotických teliesok.

Zápál mliečnej žľazy alebo mastitída, je vážnou zdravotnou záťažou. Preto sa na ňu zameriavajú vedecké a odborné štúdie. V chovoch pôsobí nemalé ekonomické straty rozsahu 5 až 24 % Tak ako v každom ochorení aj tu hrá imunitná odpoveď dôležitú úlohu a s ňou spojené aj mononukleárne bunky a ich osud v organizme.

Vzhľadom k vyššie popísaným faktom významnosti tejto témy je cieľom mojej bakalárskej práce spracovanej na tému “apoptóza mononukleárnych buniek a makrofágov mliečnej žľazy hovädzieho dobytká“ podrobne preštudovať dostupné literárne zdroje a zoskupiť najnovšie poznatky v tejto oblasti. Bakalárska práca tak bude môcť poskytnúť ucelené informácie v oblasti apoptózy mononukleárnych buniek a makrofágov mliečnej žľazy hovädzieho dobytká.

2 LITERÁRNY PREHĽAD

2.1 Mononukleárne bunky

Mononukleárne bunky taktiež známe ako lymfocyty, monocyty a makrofágy sú funkčne heterogénnou populáciou imunitných buniek (Toman a kol., 2000). Krvné monocyty majú pôvod v kostnej dreni. Potom z nej vstúpia do cirkulácie v krvi. Tieto bunky ďalej cirkulujú v krvi, neskôr prestúpia do tkanív a stanú sa z nich rezidentné tkanivové makrofágy. Tieto bunky môžeme nazvať mononukleárne fagocyty (MF). MF zdieľajú niekoľko vlastností, napríklad: morfológiu a ultraštruktúru sledovateľnú pomocou svetelnej a elektrónovej mikroskopie, expresiu enzýmov (nešpecifická esteráza, lyzozomálne hydrolázy a ektoenzými), nešpecifický príjem častíc a špecifické endocytické receptory. Spolu tieto bunky tvoria mononukleárny fagocytový systém (Hume a kol., 2002).

2.1.1 Krvné monocyty

Monocyty sú súčasťou nešpecifickej imunitnej reakcie. Jadro je obličkového tvaru. Ich výskyt v periférnej krvi hovädzieho dobytku sa pohybuje od 2 do 10 %. V organizme zastávajú niekoľko úloh: doplňujú makrofágy, reagujú na zápalové signály (Takáčiková, 2014).

Monocyty reagujú rýchlo na zápalové signály. Do miesta zápalu sa dostanú približne za 8 až 12 hodín, kde sa ďalej diferencujú na makrofágy alebo denritické bunky ktoré vyvolávajú imunitnú reakciu (Swirski a kol., 2009).

Monocyty reprezentujú dôležitú časť hostiteľovej imunitnej obrany. Avšak ich nadmerná koncentrácia môže byť škodlivá a zhoršovať niektoré choroby ako napríklad: arterioskleróza, artritída, a skleróza multiplex (Parihar a kol., 2009).

Subpopulácie monocytov môžeme deliť na základe diferenciácie skupiny (CD). Doteraz boli popísané štyri subpopulácie monocytov periférnej krvi prasiat. Prasacie monocyty majú vysokú expresiu CD172a. Na základe CD14, CD163, a SLA – DR (*monoclonal antibody*) expresie môžeme rozdeliť prasacie monocyty ďalšie subpopulácie (Chamorro a kol., 2005; Ondračková a kol., 2010). Molekula CD14, vyskytujúca sa na monocytoch vykazuje schopnosť väzby LPS (*lipopolysacharid*) (Sanz a kol., 2013). Tieto subpopulácie sa vyvíjajú behom iniciačnej fázy diferenciácie v kostnej dreni (Ezquerro a kol., 2009; Ondračková a kol., 2010). Monocyty a ich subpopulácie sú dôležité v imunitnej obrane proti širokej škále mikrobiálnych infekcií (Serbina a kol., 2008).

2.1.1.1 Diferenciácia monocytov a ich maturácia

Pôvod monocytov je v kostnej dreni. Monocytopenza je koordinovaná cez sériu úzko spolupracujúcich proliferačných a diferenciálnych signálov. Signáli umožňujú maturáciu pluripotentnej kmeňovej bunky na monocyt (Santangelo a kol., 2001). Monocyty sa vyvíjajú cez spoločný CFU-GEMM (prekurzor nelymfatických buniek), CF-GM (spoločný prekursor granulocytov a makrofágov) a CF-M (prekurzor makrofágov), pod vplyvom cytokínov IL- 3 (*interleukín*), GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) a M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*). Ďalej proliferujú na monoblasty a promocyty (Toman a kol., 2009). Monoblasty sa pod vplyvom rastových faktorov CSF (*faktor stimulujúci kolónie*) diferencujú na promonocyty a tieto počas šiestich dní sa diferencujú ďalej na monocyty, ktoré sa usídľujú v tkanivách a ďalej tu diferencujú na makrofágy. V závislosti od prítomnosti či neprítomnosti chemotaktívneho receptora CCR2 sa monocyty do tkanív dostávajú rozdielne. Monocyty CCR2⁺ idú preferenčne do zápalových ložísk a žijú krátko, monocyty CCR2⁻ zas do normálnych zápalovo neovplyvnených tkanív a sú prekuzormi tkanivových makrofágov a dendritových buniek (Buc a kol., 2009).

Behom zrenia monocytov na makrofágy sa zväčšuje počet lyzozómov, receptorov pre Fc fragment IgG a receptorov pre C3 zložku komplementu, zvyšuje sa schopnosť fagocytózy a opsonizácie (Takáčiková, 2014). V prípade zápalového ochorenia sa monocyty z krvi do tkanív dostávajú tak, že sa zachytávajú na povrchu endotelií zápalových tkanív za pomoci adhezívnych molekúl β 1 integrínov a VCAM – 1 (*vascular cell adhesion molecule*). Do miesta zápalu smerujú rôzne chemotaktické faktory. Tie riadia pohyb buniek v smere chemotaktívneho gradientu. Hlavnými chemotaktickými látkami sú MIP - 1 α a β a RANTES. Ďalšími dôležitými látkami sú komplementové fragmenty C3a a C5a, leukotrein B₄, faktor aktivujúci doštičky a chemotaktické peptidy pochádzajúce z bakteriálnych proteínov fMLP (*formyl – metionylleucinphenylalanin*), pre všetky tieto látky majú monocyty príslušné receptory (Bartuňková 2014). Niektoré makrofágy môžu sa aj deliť, lokálne proliferovať. Napríklad len asi 30 % alveolových makrofágov pochádza z monocytov. Naproti tomu až 90 % makrofágov pečene pochádza z monocytov a len zvyšných 10 % sa tvorí na mieste. Makrofágy sú dlho žijúce bunky a pokiaľ ich neaktivuje zápalový proces, niektoré makrofágy navzájom splyvajú a vytvárajú obrovské bunky. Niektoré pohltené častice sú pre makrofágy toxické a zabíjajú ich. Keď sa po zničení bunky dostanú opäť častice do prostredia a bunky ich znova pohltia a proces sa opakuje. Pri poškodení makrofágov sa ich obsah dostáva do mikroprostredia a proteolytické enzýmy tak poškodzujú vlastné tkanivo (Buc a kol., 2009).



Obr. č. 1 – Monocyt (Wikipedia)

2.1.2 Makrofágy

Makrofágy sú bunky prirodzenej imunity. Majú jadro obličkového tvaru, v cytoplazme majú početné lyzozómy, s prítomnosťou mnohých proteolýtických enzýmov. Prítomné sú aj početné cisterny hladkého a granulovaného endoplazmatického retikula (Polák, 2013). Dokážu produkovať tráviace enzýmy a ich inhibitory, zložkyklasickéj a alternatívnej dráhy komplementu a ich regulačné proteíny, reaktívne metabolity kyslíku a dusíku a ich inhibitory (interleukin – 10), cytokiny zápalu, chemokiny, diferenciačné faktory, transferin a ďalšie transportné proteíny, angiogenetické faktory a účinné látky (Takáčiková 2014).

Ich funkcia je riadenie hemopoézy, hemostázy a hojenie rán, deštrukcia mikroorganizmov a regulácia zápalu, odstránenie mŕtvych buniek, regenerácia tkanív, cytotoxické reakcie, prezentácia antigénov T lymfocytom, regulácia dvoch typov odpovedí a regulácia tolerancie napríklad na materskom-fetálom rozhraní. Podľa miesta ich výskytu vykazujú značnú heterogenitu. Patria k nim Kupfferove bunky pečene, alveolárne a perivaskulárne pľúcne makrofágy, histiocyty spojiva, osteoklasty v kostiach, synoviálne A bunky, mikrogilie CNS, mezanigálne bunky, makrofágy marginálnej zóny sleziny a germiálnych centier, peritoneálne a pleurálne makrofágy, bunky mliečnych škvŕn omenta, makrofágy žilných splavov, červenej pulpy sleziny a tymu. Sú aktivované najmä bakteriálnym LPS a interferonom- γ (INF- γ) (Toman a kol., 2000).

Makrofágy patria medzi profesionálne fagocyty, migrujú do ohnísk zápalu po 6 až 12 hodinách, vydržia tam dlhšie než granulocyty a riadia jeho priebeh (Takáčiková, 2014). Procesom efferocyózy dokážu fagocytovať apoptotické bunky, ale na rozdiel od denritických buniek nedokážu ďalej prezentovať epitopy pohltých buniek cytotoxickým lymfocytom (Toman a kol., 2009).

2.1.2.1 Efferocytóza

Efferocytóza je proces odstraňovania umierajúcich buniek profesionálnymi fagocytmi (deCathelineau a kol., 2003).

Proces efferocytózy zahrňuje niekoľko krokov, výsledkom ktorých je úspešné odstránenie apoptotických buniek. Bunka v procese apoptózy vysiela takzvaný “nájdí ma“ (find me) signál, ktorý môže byť detekovaný makrofágmi a priláka ich k miestu umierajúcich buniek. “Nájdí ma“ zahrňuje nukleotidy ATP (*adenozíntrifosfát*) a UTP (*uridíntrifosfát*), chemokíny (CX₃CL1) a lipid lyzofosfytidlycholín (LPC) (Martin a kol., 2015).

Apoptická bunka ďalej vykazuje signál “zjedz ma“ (eat me), na povrchu umierajúcej bunky, pomocou receptorov ktoré signalizujú makrofágu aby pohltil bunku. Tento signál je charakterizovaný odhalením fosfatidylserínu na povrch bunky (Ravichandran, 2011). Ako náhle je apoptická bunka pohltená, je spracovaná fagolizozomálnou cestou, ktorá degraduje a znovu využije materiál apoptickej bunky. Keď makrofág pohltí bunku, uvoľňuje mediátory, ktoré sú schopné potlačiť zápalové ochorenie. Štúdie *in vivo* dokázali že makrofágy pri procese efferocytózy uvoľňujú veľké množstvo IL – 10, TGF- β (*transforming growth factor beta*) a PGE2 (*prostaglandin E2*). Ďalej sekrety VEGF (*vascular endothelial growth factor*), ktoré sú zapojené do opravy tkanív (Martin a kol., 2015).

2.2 Apoptóza

Apoptóza je programovaná bunková smrť. Je prísne regulovaným zložitým riadeným procesom, kde dochádza k rozpadu kritických molekulárnych štruktúr. Účastní sa mnohých fyziologických dejov a je prirodzenou súčasťou mechanizmov imunitného systému. Príkladom apoptózy v organizme sú: organová involúcia, atrofia, odstránenie neaktívnych a autoreaktívnych lymfocytov. Apoptóza je dôležitým regulátorom krvotvorby, v rámci diferenciácie krvných buniek odstraňuje nefunkčné a staré bunky. Ďalej sa uplatňuje pri cytotoxickom zabíjaní infikovaných a nádorových buniek. (Toman a kol., 2000).



Obr. č. 2 - Apoptóza (Ueda a kol., 2007)

2.2.1 Biochemické procesy bunke počas apoptózy

Bunky v procese apoptózy podstupujú charakteristické biochemické zmeny, najmä zmeny cytoplazmatickej membrány – fosfolipidová orientácia, zmeny vnútrobunkovej iónovej homeostázy, pričom vo svojom cieli mieri k degradácii DNA (Alberts a kol., 2008).

Začiatok bunkovej apoptózy je prísne regulovaný, konkrétne členmi skupiny Bcl-2 proteínov. Tieto integrálne proteíny membrán sú umiestnené prevažne na jadrovej membráne, endoplazmatickom retikulu a na vonkajších membránach mitochondrií. Proteíny môžu byť proapoptické a antiapoptické, avšak pro alebo anti apoptická funkcia týchto proteínov závisí na type bunky, funkcii bunky a bunkovom prostredí. Rôzne proteíny zo skupiny Bcl-2 regulujú seba navzájom a to tak, že tvoria homo alebo hetero diméry (Gross a kol., 2006). Fosfatidylserin je v zdravých bunkách prevažne umiestnený na vnútornej strane plazmatickej membrány, avšak v počiatočných fázach apoptózy je premiestnený na vonkajšiu stranu. Molekuly fosfatidylserinu sa presunú do vonkajšej časti bunkovej membrány a spolu s vitronektinom sú signálom pre odstránenie apoptickej bunky fagocytózou. Väzba značeného proteínu annexinu V na membránový fosfatidylserin sa používa k stanoveniu apoptických buniek (Vermes a kol., 1995).

Proces je zahájený indukčným signálom alebo stratou supresívneho signálu. Indukciu vyvoláva väzba membránového proteínu Fas na svoj ligand alebo väzba cytokínu TNF- α (*tumor necrosis factor α*) na membránový receptor TNFR1. Väzba vedie k aktivácii kaspáz. K strate supresívneho signálu dôjde pri nedostatku antiapoptického cytokínu k väzbe faktoru TRAIL na svoj ligand, následne dôjde k inhibícii proteínu Bcl a poruche funkcii membránových kanálov mitochondrií a k aktivácii kaspáz (Halouzka a kol., 2009).

Zvyšovanie neviazaného vápnika a draslíka a znižovanie pH je ďalším mechanizmom prispievajúcim k apoptóze. Ďalším induktorom je ionizujúce žiarenie, ktoré vedie k tvorbe proteínu p53 a indukcii kaspáz. Kaspázy aktivujú enzým DNázu,

ktorý štiepi chromatín až na rad nukleotidov. Kaspázové kaskády podmieňujú mechanizmus vedúci k štrukturálnym zmenám bunky (Reed, 2004).

DNA sa spočiatku rozpadne na menšie fragmenty okolo 50 000 až 300 000 bp, nasleduje ďalšie intranukleozomálne štiepenie na ešte menšie fragmenty veľké okolo 180 až 200 bp (Elmore, 2007).

2.2.2 Signalizačná dráha apoptózy

2.2.2.1 Vonkajšia signalizačná dráha

Vonkajšia signalizačná dráha ktorá spúšťa proces apoptózy zahrňuje interakcie sprostredkované cez transmembránové receptory. Tieto receptory smrti sú členmi skupiny génov rodiny TNF – (*tumor nekrotizujúceho faktoru*) (Locksley a kol., 2001). Táto skupina zdieľa podobné na cystein bohatéj extracelulárnej domény. V cytoplazme sa nachádza takmer 80 aminokyselín ktoré, označujeme ako “domény smrti“. Tieto domény majú kľúčovú úlohu pri prenášaní smrteľných signálov z povrchu bunky do jadra. Najviac opísané ligandy a ich odpovedajúce receptory sú FasL/FasR, TNF α /TNFR1, Apo3l/DR3, Apo2l/DR4 a Apo2l/DR5. Kaskáda jednotlivých krokov vystihujúcich vonkajšiu signalizačnú dráhu je znázornená na modeloch FasL/FasR a TNF α /TNFR1 domény smrti (Rubio-Moscardo a kol., 2005).

V prvom prípade sa viaže Fas ligand na Fas receptor. Výsledok tejto väzby má za následok trimerizáciu receptora. Trimerizovaný receptor naverbuje väzobný proteín FADD na doménu smrti (Elmore, 2007).

Viažuci sa TNF na svoj TNF receptor vznikne väzobný proteín TRADD. Viazanie FADD na smrteľnú doménu aktivuje prokaspázu 8 ako výsledok signálu smrti. V tomto bode sa vytvorí DISC (*death-including signaling complex*). Ako

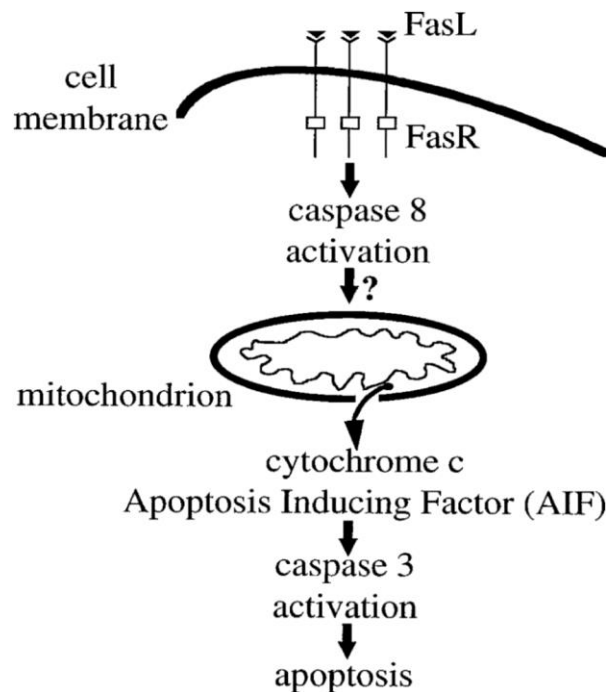
náhle je aktivovaná kaspáza 8, dráha apoptózy je spustená. Tieto signalizačné dráhy môžu byť inhibované proteínom c-FLIP, ktorý sa naviaže na FADD a kaspázu 8 a spôsobí ich nefunkčnosť. Ďalšia regulácia apoptózy môže byť spôsobená proteínom Toso ktorý blokuje Fas – dráhu apoptózy v T bunkách cez inhibíciu kaspázy 8 (Elmore, 2007).

2.2.2.2 Vnútoraná signalizačná dráha

Vnútoraná signalizačná dráha zahajuje apoptózu rozmanitou škálou nereceptorovo sprostredkovaných signálov, sú určené pre vnútorne prostredie bunky, predovšetkým pre mitochondrie. Tieto stimuly produkujúce signály môžu na bunku pôsobiť negatívne alebo pozitívne. Negatívne signály zahrňujú absenciu rastových faktorov, hormónov, cytokínov a môžu viesť k potlačeniu programov smrti, takže nedochádza k spusteniu apoptózy. Medzi pozitívne pôsobiace stimuly patria napríklad radiácia, toxíny, hypoxia, hypertermia, infekcie a voľné radikály. Všetky tieto stimuly spôsobujú zmeny na vnútornej mitochondriálnej membráne a zvyšujú tak permeabilitu mitochondriálnych pórov (Saelens a kol., 2004). Prvá skupina proapoptických proteínov pozostáva z cytochromu c/DIABLO a sérinovej proteázy HtrA2/Omi. Tieto proteíny spúšťajú kaskádu mitochondriálnej signalizačnej dráhy. Cytochrom c naviaže a aktivuje Apaf-1 proteín a tiež prokaspázu 9. Spoločne vytvoria tzv. apoptozóm. Zhlukovanie prokaspazy 9 vedie k aktivácii kaspazy 9. Smac/Diablo a HtrA2/Omi podporujú apoptózu tak, že inhibujú aktivitu IAP (inibítori apoptických proteínov) (Elmore, 2007).

2.2.2.3 Exekučná signalizačná dráha

Na vnútornú a vonkajšiu signalizačnú dráhu nadväzuje exekučná dráha. Je pokladaná za konečnú fázu apoptózy. Začína aktiváciou exekučných kaspáz, ktoré spúšťajú fázu apoptózy. Aktivujú cytoplazmatickú endonukleázu, ktorá degraduje jadrový obsah. Ďalej aktivujú proteázy, spôsobujúcu degradáciu jadrových a cytoskeletových proteínov. Kaspáza-3, kaspáza-6 a kaspáza-7 štiepia rôzne substráty vrátane cytokeratinu, PARP, proteín skeletu plazmatickej membrány - α -fordín, jadrový proteín NuMa a ostatné, čo nakoniec spôsobí biochemické a morfológické zmeny pozorované v bunkách podliehajúcich apoptóze (Slee a kol., 2001).



Obr. č. 3 - Vonkajšia signalizačná dráha apoptózy (Blake a kol., 1997)

2.2.3 Morfológické zmeny bunkových organel počas apoptózy

Bunka počas apoptózy podstupuje charakteristické a zreteľné zmeny. Bunka sa zmršťuje, vplyvom zmenšovania sa cytoplazma stáva hustejšia a organely sú tesnejšie usporiadané. Cytoplazmatická membrána sa stáva stočená a na povrchu sa vyskytujú útvary, pripomínajúce pľuzgieri. Táto fáza sa nazýva blebbing alebo zeiosa (Jantová, 2011). Membrána si však uchováva svoju integritu. Táto fáza je dobre pozorovateľná v svetelnom mikroskope. Je to jeden z najskorších znakov nevyhnutnej smrti bunky. Bunka počas apoptózy reorganizuje štruktúru cytoskeletu (Alberts a kol., 2008). Fragmentácie mikrofilamentových zväzkov vedie k celkovej plasticite bunky a podporuje znižovanie objemu a zmršťovanie bunky. Imunochemická detekcia aktínu a tubulínu odhalila, že apoptický signál ovplyvňuje ich štruktúru a mení jeho priestorové usporiadanie do kortikálneho kruhu. Tubulinový cytoskelet sa zmení do pevných zväzkov, aktínové mikrofilamenty taktiež vytvárajú spoje, ktoré sa stávajú pevnejšie, zvlášť pri perifériách. Endoplazmatické retikulum je zložené z dynamicky sa pohybujúcich trubičiek. Endoplazmatické retikulum sa zväčšuje a obsahuje viac vody. Napríklad v HeLa bunkách, podliehajúcich apoptóze, sa trubičky endoplazmatického retikula rozšírili voľne v cytoplazme, so zvýšenou hustotou v perinukleárnom priestore (Jantová, 2011). Mitochondrie v priebehu apoptózy sú fragmentované na menšie časti. V jadre nastáva takzvaná karyopyknóza. Ide o nevratnú kondenzáciu chromatinu. Po karyopyknoze nasleduje karyohexia, deštruktívna fragmentácia jadra. Tieto fragmenty obsahujú kondenzovaný chromatin, nerovnomerne rozmiestnený v cytoplazme bunky. Nakoniec sa bunka rozpadá na apoptické telieska (Jacobson, 2002).

2.2.4 Gény zapojené do apoptózy

Za posledné roky výskum genetiky viedol k identifikácii niekoľko génov zapojených do apoptózy. Boli detekované u hlístice *C. elegans*. Konkrétne sa jedná o gény *ced-3* a *ced-4* odpovedajúce za aktiváciu apoptózy a gény *ced-2* a *ced-9* zodpovedné za jej inhibíciu. U cicavcov boli objavené homologické gény. Pochádzajú

z rodiny Bcl-2. Produkt génu Bcl-2 chráni bunky pred apoptickými signálmi. Tento gén je exprimovaný v dlhožijúcich bunkách (hepatocyty, neurony) (Hay et al. 2004).

Antagonista génu Bcl-2 je gén BAX. Nadmerná produkcia proteínu BAX vedie k tvorbe homodimérov (BAX-BAX), ktoré majú pro apoptickú funkciu. Pri nízkej produkcii proteínu sa vytvárajú diméry Bcl-2-BAX, ktoré naopak chránia bunku pred smrťou (Jacobson et. al 2002). Ďalší gén zapojený do procesu apoptózy je gén p53, zodpovedný za aktiváciu génu BAX. V prípade poškodenia DNA tento gén najprv vyvolá zastavenie bunkového cyklu, aby sa DNA mohla opraviť. Ak je poškodenie neúnosné, aktivácia tohto génu vyvolá smrť bunky (Jacobson et. al 2002).

2.3 Apoptóza makrofágov a monocytov

Spúšťanie apoptózy u makrofágov závisí na pro alebo anti - apoptotickej regulácii. Makrofágy si vyvinuli mechanizmus, ktorý dokáže ovplyvniť pro apoptickú reguláciu a aktivovať dráhy na prežité, aby si zaistili dlhší životný cyklus (Sanz a kol., 2013)

Dôležité regulátory apoptózy makrofágov sú sérin/threonin kinázy, ktoré patria do rodiny proteínových kináz C (PKC) (Reynald a kol., 2007). PKC rodina pozostáva z 11 isoforiem, ktoré sú rozdelené na typické (α , β a γ), zvláštne (δ , η , ϵ a θ) a atypické (λ , ζ a τ) (Sanz a kol., 2014). Typické a atypické majú anti – apoptické vlastnosti. Avšak δ , η , ϵ a θ majú pro – apoptické vlastnosti (Reynald a kol., 2007).

Apoptóza makrofágov je pre jej veľký význam často študovaným predmetom v procese zápalu. Dokazujú to nasledujúce citácie z mnohých vedeckých publikácií.

Makrofágy majú významnú rolu v ateroskleróze. Ateroskleróza je ochorenie tepien. Nahromadenie medzibunkového cholesterolu vyvoláva apoptózu makrofágov. Voľný cholesterol sa nahromadí na membráne endoplazmatického retikula, ktorá za normálnych podmienok neobsahuje veľké koncentrácie voľného cholesterolu. Spôsobí to zmenu integrálnych proteínov a vyvolá stres ktorý neskôr spúšťa apoptózu (Tabas a kol., 2005).

Interakcia medzi mikróbmami a makrofágami hrá kľúčovú rolu v patogenéze mnohých infekcií. Niekoľko bakteriálnych patogénov spôsobuje apoptózu makrofágov, ale mechanizmus pôsobiaci pro – apopticky má rôzny priebeh. Apoptóza makrofágov je spôsobená baktériami *Shigella flexneri* pomocou pro – zápalových cytokínov. Naopak *Yersinia spp.* indukuje apoptózu potlačením signalizačných dráh, čo vedie k produkcii TNF- α a cytokínov, ktoré sú esenciálne pre kontrolu infekcie (Navarre a kol., 2000).

Existuje množstvo dôvodov, prečo sú makrofágy citlivé na patogény, ktoré vyvolávajú apoptózu. Jedným z dôvodov je expresia povrchových receptorov, ktoré rozoznávajú bakteriálne komponenty LPS a lipoproteíny. Tieto receptory neskôr aktivujú pro – apoptotickú signalizačnú dráhu (Navarre a kol., 2000).

Apoptóza makrofágov bola preukázaná aj po vyvolaní infekcii *Salmonellou*. *Salmonella* spôsobuje apoptózu infikovaných makrofágov tak, že proteín SipB vylučovaný salmonelou sa naviaže na proapoptickú kaspázu – 1, a spustí tak aktiváciu kaspáz a kaspázova kaskáda môže prebehnúť (Hernandez a kol., 2003).

Niektoré štúdie ďalej poukazujú na fakt že samotná fagocytóza baktérií *Staphylococci*, *Streptococci* a *Escherichia coli* vedie k programovanej bunkovej smrti (Frankenberg a kol., 2008).

Pietres (2008) dokazuje, že makrofágy s fagocytovanými *Mycobacterium bovis* podliehajú apoptóze, čo zabráni v ďalšiemu rozmnožovaní mykobaktérii a bezpečne ju odstráni z tela.

Oproti týmto poznatkom Valledor (2004) poskytuje dôkazy že makrofágy vystavené infekcii môžu byť proti apoptóze chránené. Konkrétne makrofágy pečene vykazovali receptor X (*liver X receptors - LXRs*) a *retinoid X receptors (RXRs)* ktoré inhibujú apoptotickú odpoveď makrofágov na M-CSF. Kombinácia LXRs a RXRs ochránila makrofágy pred apoptózou, ktoré spôsobujú infekcie baktérií *Bacillus anthracis*, *Escherichia coli* a *Salmonella typhimurium*.

2.3.1 Pro-apoptická regulácia

Typický členovia rodiny kináz, ako napríklad PKC α a PKC β zvyšujú svoju koncentráciu počas PMA – stimulácie (*Phorbol myristerovej kyseliny*) (Lin a kol., 2007). Diferenciácia myelomonocytov za pomoci TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetát) vykazuje zvýšenú koncentráciu PKC α a zníženie koncentrácie PKC δ . PKC ϵ je

aktivovaná behom tumorogenézy a taktiež môže byť aktivovaná aj pri LPS stimulácii (Sanz a kol., 2013).

Inhibícia FasR/FasL v kultúrach monocytov docieľi inhibíciu spontánnej apoptózy. Funkčná úloha Fas bola *in vivo* zhodnotená na s blokoványm FasR (Ipr/Ipr) a FasL (Ipr/gid). Obi dve myši vykazovali zápalové a rezidentné monocyty. Výsledkom boli rôzne klinické stavy lymfadenopatia, splenomegália ďalej akumulácia makrofágov v tkanivách pľúc, pečene a v slezine (Brown a kol., 2004). Všetky tieto zistenia potvrdzujú dôležitosť Fas – sprostredkovanej dráhy pri apoptóze makrofágov (Sanz a kol., 2013).

Ďalej Sanz a kol., (2013) popisuje homozygotné embryá myši s vyradenou kaspázou – 8 a kaspázou – 9 neboli životaschopné a vykazovali početné defekty v neurálnej trubici. Heterozygotné embryá prežili štyri až päť týždňov. Myši s blokovanou kaspázou – 3 neboli životaschopné a trpeli ťažkými defektmi so skorým nástupom smrti. To dokazuje že kaspáza – 3 zohráva dôležitú rolu pre apoptózu.

Dasmahaptra a kol., (2006) dokazuje že v leukemických myelomonocytických bunkách, prítomnosť proteínov Bcl – 2, Bcl – xl, a Mcl – 1 prispievalo k prežitiu bunky. Nadmerná koncentrácia proteínov Bcl – 2 a Bcl – xl v monocytoch zvyšovali odolnosť voči apoptotickým stimulom. Ochranná úloha proteínu Bcl – 2 je sprostredkovaná cez fosforyláciu AKT (*proteín kináza B*). Prítomnosť proteínov Bik, Bak, Bax, Bad a Bid bola dokázaná v línii monocytických buniek. Zmena lokalizácie týchto proteínov z cytoplazmy na mitochondriálnu membránu má za následok spustenie apoptózy (Berthier a kol., 2004).

Dimerizácia Bcl – 2 skupiny proteínov je dôležitý regulačný mechanizmus. Priama interakcia medzi homo a hetero dimérmí má za následok vo formovaní pórov na mitochondriách a uvoľnení apoptotických faktorov do cytoplazmy (Antignani a kol., 2006). Na vonkajšej cytoplazmatickej membráne, uľahčujú tvorbu pórov (Baines a kol., 2007; Paquet a kol., 2004). Bid proteín je jediný zo skupiny proteínov ktorého aktivita je regulovaná štiepením. Monocytické bunky ošetrované proteínom TRAIL vykazovali

aktiváciu kaspáz – 8, čo viedlo k štiepeniu Bid (tBid). tBid translokácia na mitochondriu spúšťa oligomerizáciu Bax/Bak a prispieva tak k vyvolaniu bunkovej smrti (Sanz a kol., 2013).

Koncentrácia Mcl – 1 proteínu v bunkách sa znižuje pri bunkách podávaním flavopiridolu zvyšuje tak apoptózu myelomonocytických buniek (Rosato a kol., 2007). V tkanivových makrofágoch odobraných pacientom trpiacimi reumatickou artritídou bol Mcl – 1 proteín vo vysokej koncentrácii. Odstránenie proteínu spôsobovalo apoptózu makrofágov (Liu a kol., 2006).

Modulácia apoptózy makrofágov počas infekcie spôsobenej mykobaktériami, je zložitý proces zahrnujúci niekoľko faktorov. Kľúčovú rolu potom hrá TNF- α (Spira a kol., 2003). TNF- α je pleiotropický cytokín, pôsobiaci cez dva odlišné receptory TNFR1 a TNFR2. Tieto receptory sa vyskytujú u rôznych bunkách. TNRF1 môže prijímať signály na prežitie aj signály smrti, zatiaľ čo TNRF2 môže prijať len signály na prežitie (Henglans 2005). TNF- α sa zúčastňuje niekoľkých krokov v imunitnej odpovedi proti mykobatériam. Je zapojený do aktivácie makrofágov. Zvyšuje produkciu cytokýnov a chemkýnov a zahajuje apoptózu (Algood a kol., 2004; Harris a kol., 2008).

2.3.2 Anti apoptická regulácia

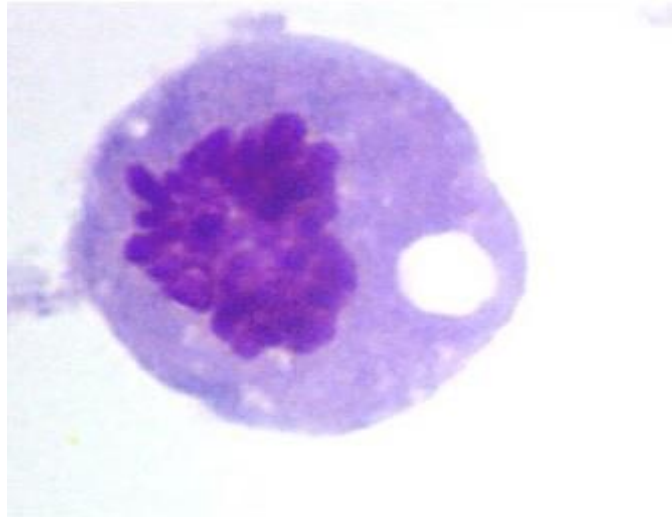
Prežitie makrofágu je zrealizované pomocou zvýšenej koncentrácie proteínov IAP, Bcl-2 a proteínmi tepelného stresu (Joazeiro a kol., 2000).

IAP alebo “inhibitor apoptózy“ je skupina proteínov ktorá bola prvý krát identifikovaná v *baculovirise*. IAP majú doménu zinkového prstu pomenovanú *Baculovirus IAP Repeat*. Doposiaľ bolo popísaných osem orthológov : XIAP (ILP-1, MIHA), ILP – 2 (Ts – IAP), cIAP – 1 (HIAP2, MIHB), cIAP – 2 (HIAP, MIHC), ML – IAP (livin, KIAP), NIAP, Survivin (TIAP) a Apollon (Bruce). Niektoré IAP majú druhý zinkový prst-RING, ktorý sa viaže ku kaspázovým doménam (Joazeiro a kol., 2000).

Najviac popísaný člen tejto rodiny je XIAP. XIAP sa priamo viaže na kaspázu – 3a inhibuje jej aktivitu. Počas apoptózy vyvolanej Fas, je XIAP štiepení na dva fragmenty. Jeden obsahuje BIR domény (BIR -1a BIR - 2) a druhý obsahuje RING doménu. Obidve sa potom viažu na rozdielne kaspázy, čo spôsobuje ich nefunkčnosť a apoptóza môže prebehnúť (Sanz a kol., 2013).

2.4 Apoptóza makrofágov mliečnej žľazy

Rezidentná populácia makrofágov v mliečnej žľaze jalovic sa skladá z dvoch morfológických odlišných populácií. Sú charakterizované ako makrofágy (vakuolizované) a makrofágy (nevakuolizované). Táto morfológická kategorizácia dvoch druhov makrofágov mliečnej žľazy hovädzieho dobytku je dôležitá, pretože dve rozdielne populácie budú aj rozdielne podliehať apoptóze (Sládek a kol., 2006). U nevakuolizovaných makrofágov je detekovaná apoptóza len v malom množstve, pretože sú to mladé bunky v porovnaní s vakuolizovanými makrofágmi (Leinter a kol 2003). Avšak apoptóza je dôležitá na uchovanie homeostázy (Liacos a kol., 2008) preto tieto bunky nie sú odolné voči apoptóze. Čo dokazujú *in vitro* štúdie. Tieto bunky *in vitro* bez akýchkoľvek stimulov podliehali apoptóze za menej ako 24 hodín (Sládek a kol., 2010). Nízka frekvencia apoptózy u nevakuolizovaných makrofágov je vysvetlená tým, že stále primajú zápalové stimuly alebo ostatné nebezpečné signály z okolia. Tieto sa menia na vakuolizované makrofágy päť alebo viacej dní po migrácií. Pri populácií vakuolizovaných makrofágov sa pozoruje vyššie percento apoptických buniek. Podobne, ako u makrofágov mliečnej žľazy je možné túto situáciu pozorovať aj v ľudských pľúcach. Alveolárne mikroprostredie zdravých ľudských pľúc preukazuje zvýšený počet apoptických alveolárnych makrofágov, pretože je potrebné zachovať homeostázu pľúc (Liacos a kol., 2008).



Obr. č. 4 - Apoptóza makrofágu (kondenzácia chromatinu, vakuolizácia) (Sládek a kol., 2010)

Predpokladá sa, že získavanie monocytov za pomoci LPS pozdržuje apoptózu. Kvôli tomu, že produkuje zápalové stimuly a predlžuje ich prežitie. LPS vyvoláva autokrinnú syntézu zápalových cytokínov, TNF – α a interleukínu – 1. Zvýšené množstvo týchto cytokýnov bolo zachytené počas iniciačnej fázy zápalového ochorenia spôsobené baktériou *Escherichia coli*. Kultivované bunky *in vitro* zaznamenali zvýšený počet apoptických buniek keď sa stimulovalo iba pomocou PBS v porovnaní s LPS. Bola na týchto bunkách zaznamenaná zvýšená expresia povrchového receptoru CD14 po kultivácii pomocou LPS *in vitro*. TNF – α a interleukín – 1 zvyšujú expresiu tohto receptora a zaisťujú tak prežitie buniek. LPS má dôležitú úlohu pri v regulácii apoptózy makrofágov mliečnej žľazy hovädzieho dobytku (Sládek a kol., 2010).

Sládek a kol., (2010) pozorovali že apoptóza vo vakuolizovaných zápalových makrofágoch prebieha vo väčšej miere ako apoptóza nevakuolizovaných makrofágov. Ďalej je známe že fagocytóza polymorfonukleárných buniek je spojená s apoptózou makrofágov. Bola pozorovaná lokálna apoptóza makrofágov, ktoré obsahujú fagocytované apoptotické bunky počas zápalu. Odstránenie týchto makrofágov hrá dôležitú úlohu v spôsobe akým bude úspešne ukončení zápal.

2.4.1 CD14 expresia v apoptotických bunkách

Nevakuolizované makrofágy mliečnej žľazy sú derivované z krvných monocytov a taktiež preukazujú podobnú expresiu CD14, ako krvné makrofágy. Na druhej strane vakuolizované makrofágy poukazujú na zvýšenú expresiu tohto povrchového receptora. Pravdepodobne je to spojené s ich "čistiacou" funkciou čo je viac typické pre tkanivové makrofágy ako pre črevné makrofágy (Smith a kol., 2011). Vysoká expresia CD14 bola taktiež pozorovaná v aleolárnych makrofágoch v pľúcach (Jiang a kol., 2003).

Sládek a kol., (2014) zaznamenali zvýšenú expresiu povrchového receptora CD14 *in vitro* u zápalových makrofágov stimulovaných za pomoci LPS ($_{INF}MAC_{LPS}$), zápalových makrofágov stimulovaných za pomoci PBS ($_{INF}MAC_{PBS}$) a rezidentných makrofágov ($_{RES}MAC$). Medzi týmito bunkami sa našlo aj veľa apoptotických a nekrotických buniek. Sládek a kol., (2014) študovali či má zvýšená expresia CD14 receptora za následok apoptózu alebo nekrózu buniek. Analyzovali apoptózu $CD14^{+}$ makrofágov a taktiež apoptózu krvných monocytov. Analýza $CD14^{+}$ makrofágov prietokovou cytometriou ukázala, že väčšina sú živé bunky s výnimkou vakuolizovaných zápalových makrofágov stimulovaných LPS, kde živé bunky dosahovali približne jednu tretinu. Zároveň bol znížený počet apoptotických a nekrotických buniek u $CD14^{+}$ makrofágoch. Je zrejme že zvýšená expresia CD14 na makrofágoch mliečnej žľazy korešponduje so znížením apoptózy.

Apoptóza rezidentných makrofágov mliečnej žľazy hovädzieho dobytku je spôsobená prirodzeným starnutím buniek (Sládek a Rysanek 2010). Preto je zaznamenaný menší výskyt apoptózy u nevakuolizovaných makrofágov ako u vakuolizovaných rezidentných makrofágoch, pretože sú to mladé bunky diferenciovane z monocytov (Bellingan a Laurent 2008).

V porovnaní s $_{RES}MAC$, apoptóza $_{INF}MAC_{LPS}$ a $_{INF}MAC_{PBS}$ je jedna zo zásadných udalostí v rezolúcii zápalovej odpovede. V mliečnej žľaze hovädzieho dobytku menší výskyt apoptózy $_{INF}MAC_{LPS}$ a $_{INF}MAC_{PBS}$ je spojený s iniciačnou fázou

zápalovej odpovede. Napriek tomu *in vitro* bolo zaznamenané to, že apoptóza $\text{INFMAC}_{\text{LPS}}$ je oneskorená v porovnaní s $\text{INFMAC}_{\text{PBS}}$ a taktiež s RESMAC . Dôvodom môže byť to že LPS vyvoláva rezistenciu apoptózy a zabezpečuje prežitie makrofágov. Oddialenie apoptózy makrofágov prispieva k rezolúcii zápalu mliečnej žľazy (Sládek a Rysanek 2010).

Sládek a Rysanek (2014) svojimi experimentmi dokázali že expresia povrchového receptoru CD14 u makrofágov mliečnej žľazy hovädzieho dobytku nie je spojená s bunkovou smrťou. Vyššia expresia receptoru CD14 odpovedá zvýšenému počtu živých buniek.

2.4.1 Metodika získavania makrofágov mliečnej žľazy hovädzieho dobytku

Bakteriálny lipopolysacharid (LPS) je silný toxín uvoľňovaný z bunkovej steny Gram negatívnych baktérii. Je často používaný ako sprostredkovateľ zápalových ochorení (Antal a kol., 2000). Podanie LPS prostredníctvom tzv. laváže do mliečnej žľazy hovädzieho dobytku vyvoláva zápalovú odpoveď. Takto ošetrovaná mliečna žľaza sa pokladá za vhodný model pre štúdium biochemických, patofyziologických a imunitných aspektov zápalu mliečnej žľazy. Prvá fáza odpovede na LPS vyvolaného zápalu je veľký prílev neutrofilov. Aktívne odstraňujú baktérie z mliečnej žľazy za predpokladu že sú tam prítomné. Mononukleárne fagocyty sú zodpovedné za zápalové procesy, sú taktiež aktivované LPS. Aktivácia monocytov, makrofágov a neutrofilov aktivovaná pomocou LPS zahŕňa dva kľúčové komponenty a to LPS binding protein (LBP) a CD14 receptor. Aktivované bunky majú na povrchu CD14, ktorý viaže LPS do komplexu spolu s LBP. Tento komplex, u makrofágov iniciuje produkciu pro – zápalových cytokínov ako napríklad TNF – α a interleukín 6. CD14 receptor taktiež viaže komponenty bunkovej steny gram pozitívnych a gram negatívnych baktérií (Sládek a kol., 2002).

2.4.1.1 Postup získavania makrofágov

Ako popisuje Sládek (2002), najvhodnejší spôsob získavania makrofágov mliečnej zľazy je jej laváž. Modifikovaný uretrálny katéter sa zavedie do struku po dezinfekcii 70% etanolom. Cez katéter sa podá 20ml PBS pri hodnote pH 7,4 do každej štvrte. Štvrte sú okamžite vypláchnuté, a tak je získaná kontrolná populácia buniek. Následne sa podá PBS alebo LPS rovnakým spôsobom. V experimente je podaných 10 ml roztoku spolu s 10 µg LPS. Štvrte sa vyplachujú v určitých časových bodoch, napríklad po 24 hodinách. Model získavania makrofágov k *in vitro* štúdiám za použitia LPS bol prvý krát použitý Wardley a kol (1976).

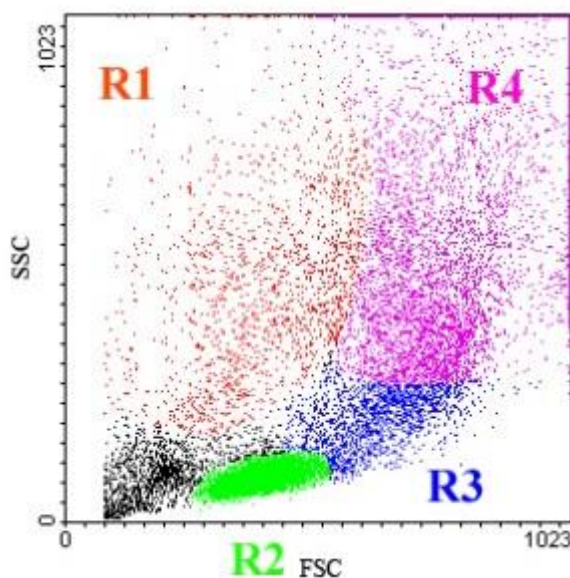
2.4.1.2 Spracovanie a kultivácia buniek *in vitro*

Bunky získane z výplachov sa následne bakteriologicky testujú na krvných agaroch (ovčia krv) pomocou aerobnej inkubácie pri teplote 37° C. Do pokusov môžu byť zaradené iba zdravé zvieratá (bakteriologický testované). Bunková suspenzia sa centrifuguje pri 4° C a 200 x g po dobu 10 minút. Jeden mililiter supernatantu je ponechaný pre opätovnú resuspenziu. Všetky bunky sa vložia do RPMI 1640 média. Časť buniek sa okamžite analyzuje ako takzvané fresh vzorky a ostatné sa inkubujú *in vitro*. Makrofágy sa umiestnia do kultivačnej doštičky a ďalej sú inkubované po dobu 0, 3 a 6 hodín pri teplote 37° C. Neskôr sú analyzované napríklad pomocou prietokovej cytometrie (Sládek a kol., 2010).

2.4.1.3 Analýza prietokovou cytometriou

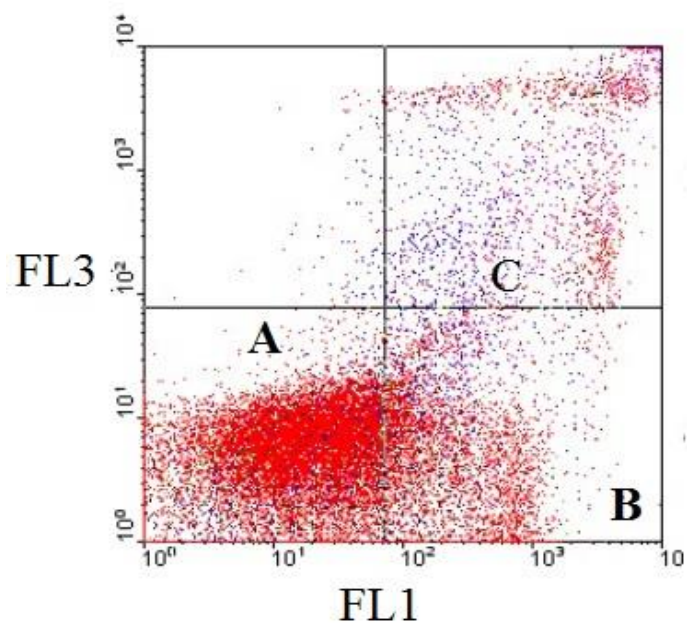
Vzorky sa rozdelia do dvoch častí na detekciu životaschopnosti (apoptóza alebo nekróza) a detekciu povrchových receptorov CD14 a CD11b. Apoptotické a nekrotické bunky sú označené annexinom – V a označené FITC (*fluorescein isothiocyanate*) a PI (*propidium iodid*), ďalej sa analyzujú pomocou prietokovej

cytometrie (metódou podľa Vermes a kol., 1995). Pre detekciu životaschopnosti je možné využiť bežne dostupný kit-Anexin – V – FLUOS, ktorý apoptické bunky rozpozná podľa vystaveného fosfatidylserínu a farebne označí. Nekrotické bunky sú značené PI. Po 20 minútach farbenia, odporúčané výrobcom, sú vzorky analyzované prietokovou cytometriou ako vyplýva z obrázku č. 4. Pre túto analýzu sa bežne používa nastavenie na hodnotenie 20 000 buniek.



Obr. č. 5 - Dot plot leukocytov z neliečenej mliečnej žľazy jalovice (Sládek a kol., 2010)

Na obrázku číslo 5 môžeme pozorovať neutrofile v regióne R1, v regióne R2 sa nachádzajú lymfocyty, regióne R3 sú pozorovateľné nevakuolizované makrofágy a v regióne R4 vakuolizované makrofágy (Sládek a kol., 2010).



Obr. č. 6 - Dot plot (Sládek a kol., 2010)

Na obrázku číslo 6 vidíme v sektore A normálne – živé bunky, v sektore B sa nachádzajú apoptické bunky a v sektore C nájdeme nekrotické bunky (Sládek a kol., 2010).

3 ZÁVER

Mastitída je zápalové ochorenie, ktoré spôsobuje značné ekonomické straty a preto sa aktívne študuje. Dôležité je štúdium nielen na úrovni klinických prejavov je nutné zacieliť až na úroveň bunkovú a biochemickú. Nových vedeckých štúdií, ktoré popisujú imunitné mechanizmy na úrovni buniek mliečnej žľazy, nie je veľa. Pre dokonalé porozumenie iniciácie, priebehu a ukončenie zápalu mliečnej žľazy je práve štúdium týchto poznatkov najdôležitejšie. Prepojenie teoretických znalostí z experimentálnej výskumnej činnosti s praxou hrá významnú rolu v poľnohospodárstve. V tejto bakalárskej práci som cielil na zhromaždenie a scelenie súčasných výsledkov z oblasti apoptózy mononukleárných buniek a makrofágov mliečnej žľazy hovädzieho dobytku.

4 ZOZNAM OBRÁZKOV

<i>Obr. č. 1 - Monocyt.....</i>	<i>- 11 -</i>
<i>Obr. č. 2 - Apoptóza (Ueda a kol., 2007).....</i>	<i>- 14 -</i>
<i>Obr. č. 3 - Vonkajšia signalizačná dráha apoptózy (Blake a kol., 1997).....</i>	<i>- 18 -</i>
<i>Obr. č. 4 - Apoptóza makrofágu (kondenzácia chromatinu, vakuolizácia) (Sládek a kol., 2010).....</i>	<i>- 26 -</i>
<i>Obr. č. 5 - Dot plot leukocytov z neliečenej mliečnej žľazy jalovice (Sládek a kol., 2010).....</i>	<i>- 30 -</i>
<i>Obr. č. 6 - Dot plot (Sládek a kol., 2010)</i>	<i>- 31 -</i>

5 PREHLAD POUŽITEJ LITERATÚRY

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. "Chapter 18 Apoptosis: Programmed Cell Death Eliminates Unwanted Cells". *Molecular Biology of the Cell (textbook)* (5th ed.). Garland Science. p. 1115. ISBN 978-0-8153-4105-5. 2008.

Algood, HM., Lin PL., Yankura D., Jones A., Chan J, Flynn JL. *TNF influences chemokine expression of macrophages in vitro and that of CD11b+ cells in vivo during Mycobacterium tuberculosis infection.* *Journal of Immunology.* 2004;172:6846–5

Antal-Szalmas, P. *Evaluation of CD14 in host defence,* *Journal Clinical Investigation.* 30 2000; 167-179.

Antignani, A., Youle, R.J. *How do Bax and Bak lead to permeabilization of the outer mitochondrial membrane?* *Curr Opin Cell Biology* 18, 2006;685-689.

Baines, C., Kaiser, R.A., Sheiko, T., Craigen, W.J., Molkenin, J.D. *Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death.* *Nat Cell Biol* 9, 2007;550-555

Bellingan, GJ., Laurent, GJ. *Fate of macrophages once having ingested apoptotic cells: Lymphatic clearance or in situ apoptosis?* In: Rossi AG, Sawatzky DA: *The Resolution of Inflammation.* Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland, 2008.

Buc, M. *Základná a klinická imunológia,* Bratislava : Veda , 2012. ISBN 978-80-224-1235-3

Dasmaphapatra, G., Almenara, J.A., Grant, S. *Flavopiridol an histone deacetylase inhibitors promote mitochondrial injury and cell death in human leukemia cells that overexpress Bcl-2.* *Molecular Pharmacology* 2006;69, 288 - 298

de Cathelineau, AM., Henso, PM. *The final step in programmed cell death: phagocytes carry apoptotic cells to the grave.* *Essays Biochemistry* 2003;39.

do Vale, A., Costa-Ramos, C., Silva, A., Silva, DS., Gärtner, F., dos Santos, NM., Silva, MT. *Systemic macrophage and neutrophil destruction by secondary necrosis induced by a bacterial exotoxin in a Gram-negative septicaemia.* *Cell Microbiology* 2007;9:988-1003.

Elmore, S. *Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death* *Toxicol Pathology* June 2007;35:495-516

Ezquerria, F., Revill, C., Alvarez, B., Alonso, A., Dominiguez, J., Perez, C.B. *Porcine myelomonocytic markers and cell populations.* *Developmental and Comparative Immunology* 2003;33:284 – 298.

Fackler, T., Grosse, R. *Cell motility through plasma membrane blebbing.* *Journal of Cell Biology.*2008;181,6:879–84.

Frankenberg, T., Krischnek, S., Häcker, H., Häcker, G. *Phagocytosis – induced apoptosis of macrophage is linked to uptake, killing and degradation of bacteria.* *European Journal of Immunology* 2008;38:204-15

Hay, B., Jun, R., Huh, Ming, G. *The genetic od cell death: Approaches, insight and opportunities in drosophila* Nature Publishing Group 2004

Halouzka, R., Krinke, J., Jelínek, F. *Veterinární patologie. 2. přeprac. a dopl. vydání* Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2009;216 ISBN 978-80-7305-062-7.

Harris, J., Hope, JC., Keane, J. *Tumor necrosis factor blockers influence macrophage responses to Mycobacterium tuberculosis.* Journal of Infections. 2008;198:1842–50.

Hehlgans, T., Pfeffer, K. *The intriguing biology of the tumor necrosis factor/tumor necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games.* Immunology. 2005;115:1–20.

Hernandez, L., Pypeart, M., Flavel, R., Galán, J. *A Salmonella protein causes macrophage cell death by inducing autophagy.* Journal of cell biology 2003.

Hume, DA., Ross, I. S. R., Himes., Sasmono, Christine A., Wells., Ravasi, T. *The mononuclear phagocyte system revisited.* Journal of Leukocyte Biology 2002;72:621-627.

Chamorro, S., Revall, C., Alvarez, B., Alonso, F., Ezquerra, A., Dominiguez, J. *Phenotypic and functional heterogeneity of porcine blood monocytes and its relation with maturation.* Immunology 2005;114:63 – 17.

Jacobson, M., McCarthy, N. *Apoptosis The molecular biology of programmed cell death* Oxford press 2002.

Jantová, S. *Viabilita, proliferácia a smrť buniek kultivovaných in vitro podmienkach.* Bratislava : Nakladateľstvo STU, 2011. ISBN 978-80-227-3464-6.

Jiang. JX., Chen, YH., Xie, GQ., Ji SH., Liu DW., Qiu, J. *Intrapulmonary expression of scavenger receptor and CD14 and their relation to I, 2003.*

Leitner, G., Eligulashvily, R. Krifucks, O., Perl, S., Saran, A. *Immune cell differentiation in mammary gland tissues and milk of cows chronically infected with *Staphylococcus aureus*.* Journal of Veterinary Medicine B Infection and Diseases in Veterinary Public Health 2003;50:45–52,

Liacos, C., Konstadoulakis, MM., Economou, V., Katsaragakis, S., Chatzianni, E., Georgiadis, GG., Prekates, A., Karampinis, A., Bramis, J. *Increased apoptosis in the alveolar microenvironment of the healthy human lung.* Journal of Surgeons Res 2008;145:186-191.

Lin Y. F., Lee, H.M., Leu. S.J., Tsai, Y.H. *The essentiality of PKC α and PKC β translocation for CD14⁺ monocyte differentiation towards macrophages and dendritic cells, respectively.* J Cell Biochem 2007;102:429-441

Liu, H., Ma, Y., Cole, S.M., Zander, C., Chen, K.H., Karras, J., Pope, M. *Serine phosphorylation of STAT3 is essential for MCL-1 expression and macrophage survival.* Blood 2003;102:344-352.

Locksley, RM., Killeen, N., Lenardo, MJ. *The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology.* Cell. 2001;104:487–501.

Martin, K., Delphine, O., Witko-Sarsa, V. *“Promoting apoptosis and phagocytosis by macrophages: novel strategies in the resolution of inflammation“* 2015

Monocyte. In: Wikipedia: the free encyclopedia [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2015-04-15]. Dostupné z: <http://en.wikipedia.org/wiki/Monocyte>

Navarre, WW., Zychlinsky, A. *Pathogen-induced apoptosis of macrophages: a common end for different pathogenic strategies* Cellular Microbiology, August, 2000

Ondrackova, P., Nechvatalova, K., Kucerova, Z., Leva, L., Dominguez, J., Faldyna, M. *Porcine mononuclear phagocyte subpopulations in lung, blood and bone marrow: dynamics during induced Actinobacillus pleuropneumoniae.* Veterinary Research 2010;41:64 – 78.

Ondrackova, P., Matiasovic, J., Dominguez, J., Faldyna, M. *Phenotypic characterisation of the monocyte subpopulations in healthy adult pigs and Salmonella – infected piglets by seven-colour cytometry.* Veterinary Research, 2013;96:240-245.

Paquet, C., Schmitt, E., Beauchemin, M., Bertrand, R. *Activation of multidomain and BH3-only pro-apoptotic Bcl-2 family members in p53-defective cells.* Apoptosis 2004;9:815-831

Parihar, A., Eubank, TD., Doseff, AI. *Monocytes and Macrophages Regulate Immunity through Dynamic Networks of Survival and Cell Death.* Journal of Innate Immunity. 2010;2:204-215.

Pieters, J. *Mycobacterium tuberculosis and the macrophage: maintaining a balance.* Cell Host Microbe.2008;3:399–407

Ravagnan, L., Roumier, T., Kroemer, G. *Mitochondria, the killer organelles and their weapons.* J Cell Physiol. 2002;192:131–7

Reed, J. *Mechanisms of Apoptosis.* The American Journal of Pathology. 2000;157: 1415-1430.

Reynald, M. *Protein Kinase C and apoptosis.* In : Apoptosis, Cell signaling and Human Diseases. 2007;31-55.

Rodrigues, MF., Barsante, MM., Alves, CCS. *Apoptosis of macrophages during pulmonary Mycobacterium bovis infection: correlation with intracellular bacillary load and cytokine levels.* Immunology. 2009;128:691-e699.

Rubio-Moscardo, F., Blesa, D., Mestre, C., Siebert, R., Balasas, T., Benito, A., Rosenwald, A., Climent, J., Martinez, JI., Schilhabel, M., Karran, EL., Gesk, S., Esteller, M., deLeeuw, R., Staudt, LM., Fernandez-Luna, JL., Pinkel, D., Dyer, MJ., Martinez-Climent, JA. *Characterization of 8p21.3 chromosomal deletions in B-cell lymphoma: TRAIL-R1 and TRAIL-R2 as candidate dosage-dependent tumor suppressor genes.* Blood. 2005;106:3214–22

Santangelo, S., Gamelli, RL., Shankar, R. *Myeloid Commitment Shifts Toward Monocytopoiesis After Thermal Injury and Sepsis.* Annals of Surgery. 2001;233:97-106.

Sanz, AB., Sanchez-Niño, MD., Izquierdo, MC., Gonzalez-Espinoza, L., Ucerro, AC., Poveda, J., Ruiz-Andres, O., Ruiz-Ortega, M., Selgas, R., Egido, J., Ortiz, A. *Macrophages and recently identified forms of cell death.* Review of Immunolgy. 2014 Jan;33:9-22.

Serbina, N.V., Jia, T., Hohl, T.M., Pamer, E.G. *Monocyte – mediated defense against microbial pathogens.* Annual Review of immunology and Immunopathology, 2008;26:421-452

Sladek, Z., Rysanek, D., Faldyna, M. *Activation of phagocytes during initiation and resolution of mammary gland injury induced by lipopolysaccharide.* Veterinary Research 2002;33:191–204

Sladek, Z., Rysanek, D. *Apoptosis of resident and inflammatory macrophages before and during the inflammatory response of the virgin bovine mammary gland.* Acta Veterinaria Scandinavica 2010;52:12–22.

Sladek, Z., Ryznarova, H., Rysanek D. *Macrophages of the bovine heifer mammary gland: morphological features during initiation and resolution of the inflammatory response.* Anatomy, Histology and Embryology 2006;35:116-124.

Sladek, Z., Rysanek, D. *CD14 expression, apoptosis and necrosis in resident and inflammatory macrophages from virgin bovine mammary gland* Veterinarni Medicina, 2014;59:467–478.

Slee, EA., Adrain, C., Martin, SJ. *Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the apoptosis.*

Smith, PD., Smythies, LE., Shen, R., Greenwell-Wild, T., Gliozzi, M., Wahl SM. *Intestinal macrophages and response to microbial encroachment.* Mucosal Immunology 2011;4:31–42.

Spira, A., Carroll, J.D., Liu, G., Aziz, Z., Shah, V., Kornfeld, H., Keane J. *Apoptosis genes in human alveolar macrophages infected with virulent or attenuated Mycobacterium tuberculosis: a pivotal role for tumor necrosis factor* Journal of Respiratory Cell Molecule Biology 2003;29:545–5

Strauss – Ayali, D., Conrad, S.M., Mosser, D.M. *Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection.* Journal of Leukocyte Biology 2007;82:244-252.

Susin, S., Daugas, E., Ravagnan, L., Naoufal, Z., Markus, L., Costantini, P., Karine, F., Theano, I., Prévost, M., Brothers, G., Tak, W., Penninger, J., Earnsha, W., Guido, K. *Two Distinct Pathways Leading to Nuclear Apoptosis.* Journal of Experimental Medicine. 2000;192: 571–80.

Swirski, F.K., Nahrendorf, M., Etzrodt, M., Wildgruber, M., Cortez-Retamozo, V., Panizzi, P., Figueiredo, J-L., Kohler, R.H., Chudnovskiy, A., Waterman, P., Aikawa, E., Mempel, T.R., Libby, P., Weissleder, R., Pittet, M.J. *"Identification of Splenic Reservoir Monocytes and Their Deployment to Inflammatory Sites"* Science 2009;325

Tabas, I. *Consequences and Therapeutic Implications of Macrophage Apoptosis in Atherosclerosis.* Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 2005; 25: 2255-2264

Takáčiková, Ľ. *Veterinárna imunológia*, V Košiciach : Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie 2014 ISBN 978-80-8077-392-2

Toman, M. *Veterinárni imunologie.* 1. vydání. Praha: Grada, 2000, 413 s. ISBN 80-7169-727-3.

Ueda, H., Ryousuke, F., Akira, Y., Hayato, M., Ueda, M. *Identification of prothymosin-alpha1, the necrosis-apoptosis switch molecule in cortical neuronal cultures.* Journal of Cell Biology.: 2007, 176;853-62

Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., Reutelingsperger, C. *A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V.* Journal of Immunology methods. 1995;17;184:39-51.

Wardley, R.C., Rouse, B.T., Babiuk, L.A. *The mammary gland of the ox: a convenient source for the repeated collection of neutrophils and macrophages.* J. Reticuloendothel. Soc. 1976;19:29-36.

6 ZOZNAM SKRATIEK

Apo3l	Apo3 ligand, skupina ligandov
ATP	Adenozíntrifosfát
BAX	regulátor apoptózy z rodiny proteínov Bcl - 2
Bcl - 2	B-cell lymphoma 2
c - flip	cellular FLICE-like inhibitory protein
c/Diablo	direct IAP binding protein with low pI
C3a, C5a	komplement, skupina komplementov
CCR2	receptor pre chemkýni typ 2
CD	diferenciačná skupina
ced	skupina génov hlístice <i>C. elegans</i>
CF-GM	spoločný prekursor granulocytov a makrofágov
CF-M	prekursor makrofágov
CFU-GEMM	prekursor nelymfatických buniek
CSF	kolónie stimulujúci faktor
DNA	kyselina deoxyribonukleónova
DR3	receptor zo skupny TNF, DR skupina receptorov
FADD	Fas-Associated protein with Death Domain
Fasl	Fas ligand, transmembránový proteín
FasR	Fas receptor
fMLP	formyl - metionylleucinphenylalanin
Htra2	sérin peptidáza
IAP	inibítori apoptických proteínov
IgG	imunoglobulín G
IL - 3	interleukín, skupina iterleukínov
INF-γ	Interferon
LBP	LPS viažuci proteín
LPC	Lyzofosfytydlycholin
LPS	bakteriálny lipopolysacharid

LXR	pečnové receptory X
Mcl – 1	regulátor apoptózy z rodiny Bcl – 2
M-CSF	kolonie stimulujúci faktor makrofágov
MIP	Macrophage Inflammatory Protein
NuMA	jadrový proteín
p53	proteín kódovaný génom TP53
PARP	proteín skeletu cytoplazmatickej membrány
PGE2	prostaglandin E2
PKC	skupina proteín kináz
PMA	phorbol myristate acetát
RANTES	regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted
RXR	retinoidné receptory X
SLA – DR	monoklonálna protilátka
tBid	membrane-targeted death ligand
TGF- β	transforming growth factor beta
TNFR1	membránový receptor
TNF-α t	tumor nekrotizujúci faktor
Toso	proteín povrchového receptora myších buniek
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetát
TRADD	tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
UTP	Uridíntrifosfát
VCAM – 1	vascular cell adhesion molecule
VEGF	vascular endothelial growth factor
XIAP	ihibítor apoptózy patriaci do skupiny IAP