

**MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ
AGRONOMICKÁ FAKULTA**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BRNO 2017

MONIKA KLIMEŠOVÁ



Agronomická
fakulta

Mendelova
univerzita
v Brně



Role apoptózy a nekrózy makrofágů mléčné žlázy skotu

Bakalářská práce

Vedoucí práce:

prof. MVDr. Zbyšek Sládek, Ph.D.

Vypracovala:

Monika Klimešová

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Zpracovatelka: **Monika Klimešová**
Studijní program: Zootechnika
Obor: Zootechnika
Konzultant: MVDr. Martin Faldyna, PhD
Název tématu: **Role apoptózy a nekrózy makrofágů mléčné žlázy skotu.**
Rozsah práce: 30-40 s.

Zásady pro vypracování:

1. Zhodnocení aktuálního stavu informací o struktuře a funkci mléčné žlázy skotu a jejího obranného systému.
2. Biologická charakteristika apoptózy a nekrózy buněk.
3. Výskyt apoptózy a nekrózy, průběh a důsledky u makrofágů mléčné žlázy skotu.
4. Význam apoptózy a nekrózy během zánětu mléčné žlázy skotu.

Seznam odborné literatury:

1. Kol. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. Ústí nad Labem: Espero Publishing, 1998. 630 s. ISBN 80-902906-0-4.
2. TOMAN, M. a kol. *Veterinární imunologie*. 2. vyd. Praha: Grada, 2009. 392 s. ISBN 978-80-247-2464-5.
3. ALBERTS, B. a kol. *Základy buněčné biologie*. Ústí nad Labem: Expert Publishing, s. r. o., 1998. 540 s. ISBN 80-902906-0-4.
4. National Library of Medicine – dostupná na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>
5. Veterinární medicína – dostupná na: <http://vetmed.vri.cz/>
6. Web of science – dostupná na: <http://portal.isiknowledge.com/portal.cgi?Init=Yes&SID=T1kpkg8NhLBBNIMjIbn>

Datum zadání bakalářské práce: říjen 2015

Termín odevzdání bakalářské práce: duben 2017

Klimešová

Monika Klimešová
Autorka práce



Sládek
prof. MVDr. Zbyněk Sládek, Ph.D.
Vedoucí práce

Havlíček
doc. Dr. Ing. Zdeněk Havlíček
Vedoucí ústavu

Ryant
doc. Ing. Pavel Ryant, Ph.D.
Děkan AF MENDELU

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: Role apoptózy a nekrózy makrofágů mléčné žlázy skotu vypracoval/a samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a v souladu s platnou Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací.

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

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

V Brně dne:

.....

Podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu své bakalářské práce, panu prof. MVDr. Zbyškovi Sládkovi, Ph.D., za ochotu, odborné vedení, věcné připomínky při vypracovávání bakalářské práce a za čas, který mi věnoval. Dále bych chtěla poděkovat mé rodině za podporu během celého studia a také mé sestře Bc. Martině Klimešové za její pomoc, ochotu a cenné připomínky.

ABSTRAKT

Bakalářská práce Role apoptózy a nekrózy makrofágů mléčné žlázy skotu podává přehled o makrofázích, které jsou součástí nespecifické imunity. Popisuje jejich vývoj z pluripotentních buněk kostní dřene přes monocyty k makrofágům a jejich význam v mléčné žláze, který zahrnuje fagocytózu mikroorganismů a odumřelých buněk, produkci cytokinů a stimulaci buněk, které regulují zánětlivé reakce.

V další části je bakalářská práce zaměřena na jednotlivé typy buněčné smrti (apoptózu a nekrózu). Jsou zde popsány jejich strukturální, biochemické a genetické znaky a následné děje, které probíhají po odumření buněk, tj. odstranění odumřelých buněk z organismu. Neméně významný jsou rovněž následky odumřelých buněk na okolní tkáň. V závěru práce jsou shrnuty základní rozdíly mezi apoptózou a nekrózou a jejich role během zánětlivé reakce mléčné žlázy skotu.

Klíčová slova: buněčná smrt, fagocytóza, monocyty, mastitida

ABSTRACT

This bachelor thesis is aimed to the role of apoptosis and necrosis of bovine mammary gland macrophages provides an overview of macrophages that are part of nonspecific immunity. It describes their development from pluripotent bone marrow cells via monocytes to macrophages and their importance in the bovine mammary gland, which includes the phagocytosis of microorganisms and dead cells, the production of cytokines, and the stimulation of cells that regulate inflammatory responses.

In the next part the bachelor thesis is focused on individual types of cell death (apoptosis and necrosis). They describe their structural, biochemical and genetic features and subsequent events that take place after cell death, ie. the removal of dead cells from the organism. The effects of cell death on the surrounding tissue are also of no significance. At the end of the work are summarized the basic differences between apoptosis and necrosis and their roles during the inflammation of the bovine mammary gland.

Key words: dead cells, phagocytosis, monocytes, mastitis

OBSAH

1	Úvod.....	10
2	Cíl práce	11
3	Literární přehled.....	12
3.1	Imunitní systém.....	12
3.2	Makrofágy mléčné žlázy.....	13
3.2.1	Vznik monocytů / makrofágů.....	14
3.2.2	Vývoj monocytů / makrofágů.....	15
3.2.3	Adheze	15
3.2.4	Diapedeze	16
3.2.5	Migrace.....	16
3.2.6	Procesy makrofágů v imunitě.....	17
3.3	Apoptóza.....	21
3.3.1	Strukturální znaky apoptózy.....	22
3.3.2	Biochemické znaky apoptózy.....	22
3.3.3	Genetické znaky apoptózy.....	23
3.3.4	Osud apoptotických buněk	24
3.4	Nekróza.....	26
3.4.1	Strukturální znaky nekrózy.....	27
3.4.2	Biochemické znaky nekrózy.....	28
3.4.3	Genetické znaky nekrózy	29
3.4.4	Osud nekrotických buněk	30
3.5	Porovnání apoptózy a nekrózy.....	31
3.6	Zánět mléčné žlázy	33
3.7	Apoptóza makrofágů mléčné žlázy skotu.....	36

4	Závěr	38
5	Zdroje	39
6	Seznam obrázků	45
7	Seznam zkratek	46

1 ÚVOD

Zánět mléčné žlázy neboli mastitida je jednou z nejčastějších onemocnění dojnic. Mastitida je polyfaktoriální onemocnění, které vzniká interakcí mezi jedincem, prostředím a patogenem. Zvýšené procento onemocnění mastitidami je ovlivněno šlechtěním skotu na vyšší užitkovost, tzn. že při šlechtění na vyšší užitkovost se zvyšuje citlivost dojnic na záněty mléčné žlázy. Proto není jednoduché mu předcházet či zamezit. Mastitida se ve velké míře promítá i do užitkovosti a zároveň do ekonomiky chovu a jeho rentability, proto v dnešní době s vysokými nádoji a vysokými nároky na parametry mléka je jednou z nejvíce řešených a zkoumaných onemocnění.

Bakalářská práce je zaměřena na makrofágy zajišťující v mléčné žláze nespecifickou (přirozenou) imunitu. Zaujímají ve zdravé laktující mléčné žláze převážnou část buněk, a tedy i jako první reagují na proniknuvší patogeny. Makrofágy jsou buňkami dozrávajících z monocytů po průchodu z krevního řečiště do tkání. Mají v imunitním systému důležitou funkci, jež zahrnuje fagocytózu mikroorganismů (patogenů) a odumřelých buněk, produkci cytokinů, které aktivují další buňky imunitního systému, a regulaci zánětlivé reakce.

Jako každý jiný typ buňky jsou rovněž makrofágy smrtelné. Podléhají dvěma formám buněčné smrti – apoptóze a nekróze. Zatímco apoptóza je přirozený, geneticky naprogramovaný a pro tkáň bezpečný typ smrti, nekróza představuje akcidentální smrt s histotoxickým účinkem na okolní tkáň.

Význam apoptózy a nekrózy u makrofágů mléčné žlázy je předmětem této bakalářské práce.

2 CÍL PRÁCE

Makrofágy hrají významnou roli v obranném systému mléčné žlázy skotu. Procesy vedoucí k jejich smrti snižují samotnou obranyschopnost tohoto orgánu vůči pronikajícím patogenním mikroorganismům.

Cílem této bakalářské práce je pojednat o apoptóze a nekróze makrofágů mléčné žlázy skotu a jejich významu pro zachování homeostázy tohoto orgánu.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Imunitní systém

Imunitní systém se podílí společně se systémem nervovým a endokrinním na udržení stálého vnitřního prostředí – homeostázy organismu. Funkcí imunitního systému je schopnost zajistit rozpoznání a odstraňování nefunkčních složek organismu. Mezi tyto složky řadíme buňky staré, mrtvé, nádorové, nemocné či tělu cizí. Tyto buňky jsou rozpoznávány od běžných složek organismu, proti kterým za fyziologických podmínek systém nereaguje. Jsou odstraňovány pomocí dvou mechanismů apoptózy a nekrózy (Toman a kol., 2009; Otová a kol., 2014).

Imunitní systém je složen z molekul a buněk, které jsou rozmístěny v rozsahu celého organismu a zároveň tvoří specializované lymfatické orgány. Imunitní buňky jsou vybaveny stovkami různých molekul. Tyto molekuly na povrchu buněk jsou zvláště receptory, které jsou schopné vázat se a reagovat s ligandy dalších buněk nebo volných molekul. Antigeny se nazývají molekuly, na které je organismus schopen reagovat specifickou imunitní reakcí. Antigeny jsou rozpoznávány imunitním systémem na cizí a tělu vlastní. V průběhu embryonálního vývoje vzniká navození imunotolerance na vlastní antigeny (Toman a kol., 2009).

Imunita je rozlišována na imunitu nespecifickou a specifickou. Nespecifická imunita je vývojově starší a vrozená. Zprostředkovávají ji buněčné a humorální komponenty vyčkávací v organismu a reagující při kontaktu s patogenem. Mezi buňky nespecifické reakce patří fagocytující buňky (neutrofil, eosinofil, monocyt – makrofág) a přirozené cytotoxické buňky (NK buňky – přirození zabíječi). Nespecifická imunitní reakce probíhá rychle a nedochází k navození imunologické paměti (Otová a Mihalová, 2013).

Specifická neboli adaptivní imunita je získávána během života, při níž je antigen rozpoznáván receptory, jež jsou jedinými bílkovinami organismu, které nejsou zakódovány v genomu, ale vyvíjejí se teprve při diferenciaci klonů lymfocytů. Klony se odlišují různými receptory s odlišnými vazebnými místy pro antigenní struktury – epitopy – antigenní determinantu. Proti každému epitopu se tvoří protilátky s odlišnou specifitou. Mezi buňky specifické imunity jsou řazeny lymfocyty (T-lymfocyty, B-lymfocyty) (Toman a kol., 2009).

3.2 Makrofágy mléčné žlázy

Mléčná žláza je orgán samic savců jejichž hlavním významem je výživa mláďat po dobu, kdy je mládě neschopno si samo obstarat potravu. Období produkce mléka se nazývá laktace. Mléčná žláza je mohutný orgán nacházející se na spodině břicha ve stydké krajině, je rozdělen dvě přední a dvě zadní čtvrtě, které jsou ventrálně zakončeny struky. Čtvrtě vemene jsou tvořeny žlázovým parenchymem, který obsahuje velké množství lalůčku (lobulů) spojených navzájem intersticiálním vazivem. Mléčná žláza je tvořena hustým krevním a mízním systémem (Marvan a Hampl, 2011).

Makrofágy mléčné žlázy vznikají transformací z monocytů po průchodu z krevního řečiště do tkání. Monocyty jsou největšími leukocyty cirkulující v krvi až 24 hodin, v tkáních přežívají i několik měsíců (Reece, 2011). V kostní dřeni se vyskytuje 93 % monocytů z celkového počtu v těle, odkud se vyplavují a udržují v krevním oběhu jejich stálou koncentraci cca 7 %, která je ovlivňována zánětlivými cytokiny a bakteriálními produkty (Hořejší a Bartůňková, 2009). Krví unášené monocyty umožňují fagocytózu bakterií, virů a komplexů antigen (protilátka). Tato jejich funkce v krevním řečišti není však tak významná jako ve tkáních (Reece, 2011).

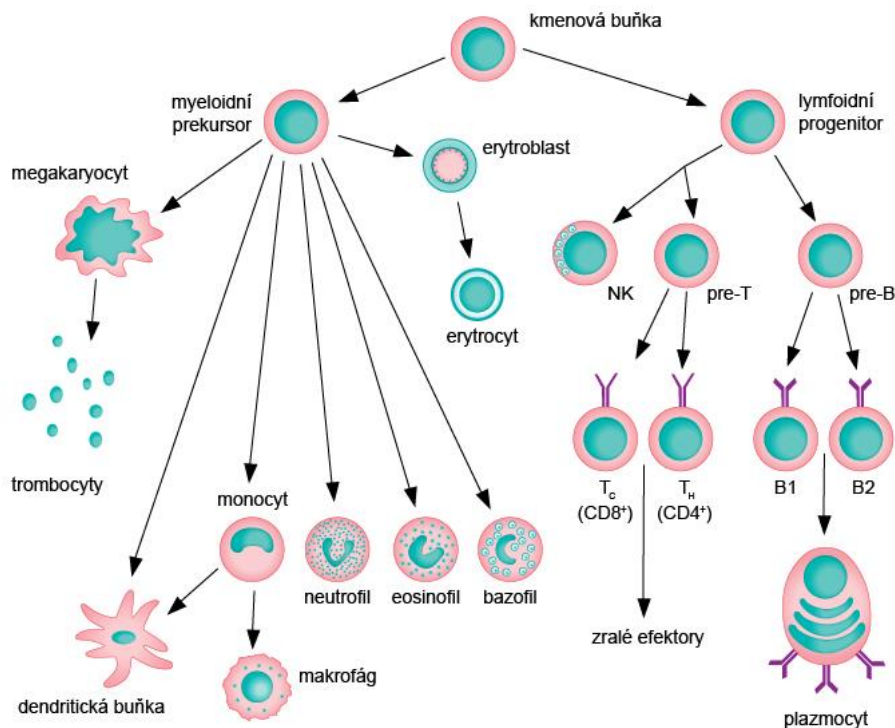
Makrofágy vznikají po prostupu z krevních kapilár do tkání z monocytů. Část makrofágů se poté diferencuje v dendritické buňky (Panczak a Otová, 2013). V závislosti na prostupu monocytů do různých typů tkáně se makrofágy diferencují do odlišných typů makrofágů, jako jsou Kupfferovy buňky jater, alveolární a perivaskulární plicní makrofágy, histiocyty pojiva, osteoklasty v kostech, synoviální A-buňky, mikroglie centrální nervové soustavy, buňky mléčných skvrn omenta, makrofágy mléčné žlázy, makrofágy žilních splavů, červené pulpy sleziny a thymu atd. (Toman a kol., 2009).

Makrofágy jsou klíčovými buňkami přirozené imunity, jejichž hlavním významem je regulace. Jsou to multifunkční buňky, které se podílejí na řízení hemopoézy, homeostázy, hojení ran, destrukce mikroorganismů a regulace zánětů (pomocí syntézy proteinů akutní tkáně), odstranění mrtvých buněk a regenerace tkání, cytotoxických reakcí, na prezentaci antigenu T-lymfocytům, na regulaci odpovědi T-lymfocytů a regulaci tolerance (Toman a kol., 2009).

3.2.1 Vznik monocytů / makrofágů

Jak už bylo řečeno, makrofágy vznikají přeměnou monocytů, které vznikají v kostní dřeni a vývojově se oddělují od granulocytové řady jako první (Haferlach, 2014). Monocyty vznikají z hemopoetických pluripotentních kmenových buněk, z kterých vznikají všechny nelymfoidní i lymfoidní řady krevních buněk. Kmenové buňky jsou vystaveny tzv. asymetrickému dělení, při kterém vzniká jedna z dceřiných buněk totožná s mateřskou kmenovou buňkou (tj. self renewal – samoobnovování kmenových buněk) a druhá podléhá další diferenciaci k zralejším kmenovým buňkám tzv. committed cells. Krevtorné řady vycházejí z kmenových buněk pro dílčí linie (Penka a kol., 2011).

Monocyty vznikají pomocí prekurzoru nelymfatických buněk, což je společný (monodendritický) prekurzor granulocytů a makrofágů, pod vlivem cytokinů. V průběhu šesti dnů dochází k jejich proliferaci a diferenciaci buněk v monoblasty a promonocyty, které jsou vyplavovány do krevního řečiště. Monocyty v krvi jsou velké neproliferující buňky s ledvinovitým jádrem (Broide, 1987; Toman a kol., 2009).

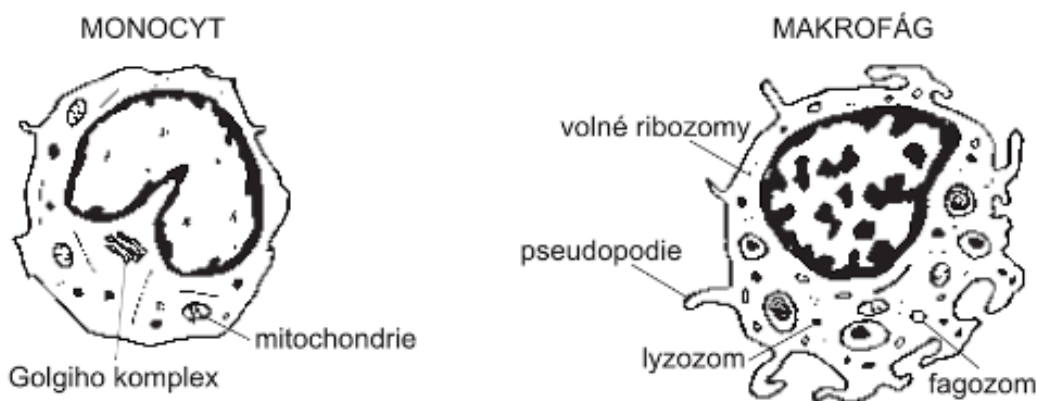


Obrázek 1: Vývoj krevních elementů z kmenové buňky (<https://publi.cz/books/151/13.html>)

3.2.2 Vývoj monocytů / makrofágů

Monocyty, které nejsou „povolány“ do tkání, zůstávají v krvi, kde časem maturují (dozrávají), čímž mohou měnit intenzitu exprese povrchových molekul a stávají se z nich „rezidentní“ monocyty. Tyto monocyty se postupně přemísťují do tkáně mléčné žlázy, kde se z nich stávají tkáňové „rezidentní“ monocyty, pomocí lokálního tkáňového mikroprostředí. Jejich úlohou v dané tkáni je vykonávání imunitního dozoru. Mobilizaci makrofágů v tkáních způsobují jak monocyty původem z krevního řečiště migrované do tkání, tak i proliferované tkáňové makrofágy (za určitých podmínek) (Toman a kol., 2009).

Jak již bylo uvedeno, monocyty (podobně jako neutrofilů) prostupují pomocí diapedézy z kapilár do tkání a adherují se na endotel (Reece, 2011). V tkáních jsou pak schopny se diferencovat v makrofágy (Toman a kol., 2009).



Obrázek 2: Morfologie monocytu a makrofágu (Toman a kol., 2009)

3.2.3 Adheze

Adheze je komunikace mezi buňkami založená na jejich přímém kontaktu pomocí adhezivních molekul. Buněčné kontakty a cílený pohyb imunitních buněk v organismu umožňují molekuly zvané adheziny (Toman a kol., 2009).

Neutrofilů a monocytů se transportují z krve zejména v postkapilárních venulách. Cílený transport umožňuje spolupráci mezi leukocyty a endotelem a je řízen cytokiny a chemokiny (Lüllmann-Rauch, 2012).

Nejdříve se „přikládají“ neutrofilů a monocytů/makrofágy ke stěně cévy do místa vedle akutního zánětu, pak probíhá tzv. rolování neutrofilů a monocytů po endotelu, což způsobuje podráždění intersticia a aktivaci endotelu, který předkládá na lumenálním

povrchu adhezní molekuly (selektiny). Ty má z části v zásobě a předává je na plasmatickou membránu, z části jsou pak nově syntetizovány. Odpovídající ligandy na povrchu monocytů umožňují selektinům volné připojení, které může být porušeno pomocí sil proudící krve. K adhezi monocytů na endotel dochází pod vlivem cytokinů v okamžiku, kdy se vyskytují na povrchu endotelu další adhezní molekuly a s pomocí působení chemokinů (z endotelu nebo z makrofágů intersticia) se aktivují integriny monocytů, které se naváží na endotelové adhezní molekuly (Lüllmann-Rauch, 2012).

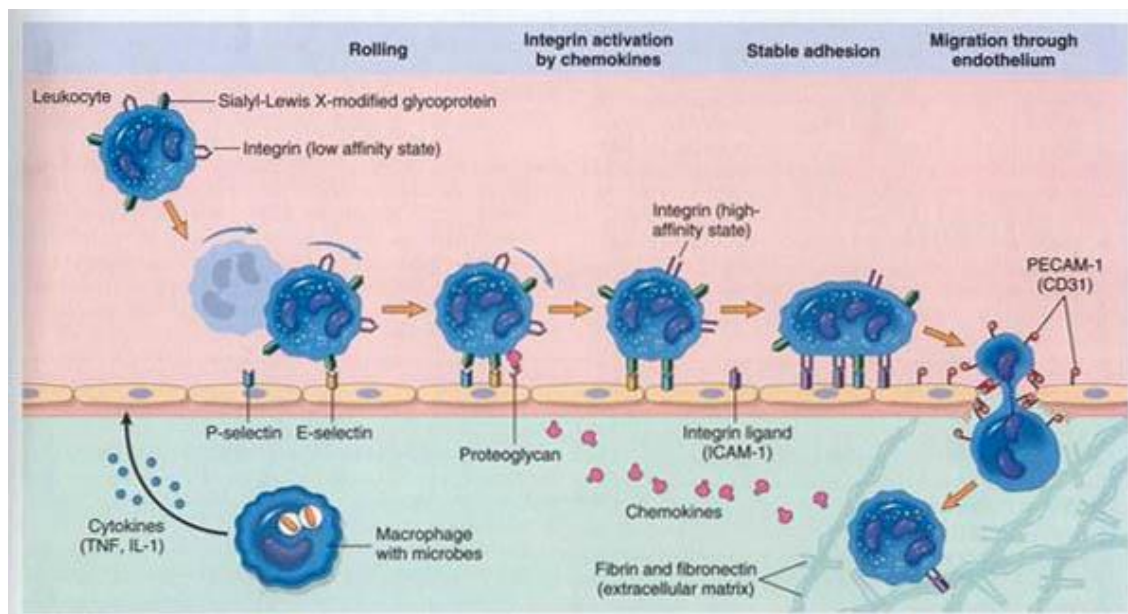
3.2.4 Diapedeze

Diapedeze je transendoteliální migrace, která je realizována z postkapilárních venul sérií adhezivních interakcí mezi adhezivními molekulami na povrchu monocytů a na buňkách cévního endotelu. Při působení selektinů, integrinů a členů imunoglobulinové superrodiny monocytů pokračují v tzv. rolování po endotelu, dokud se nevytvoří pod tlakem monocytů mezera mezi dvěma endotelovými buňkami (Ferenčík a kol., 2005; Rovenský a kol., 2006). Dochází k vsunutí výběžku monocytu do této mezery a následnému protažení jeho celého těla bez poškození (Ferenčík a kol., 2005).

3.2.5 Migrace

Migrace je děj, při kterém dochází k pohybu fagocytující buňky směrem k cizorodému materiálu. Pohyb může být spontánní nebo chemotaktický (Rokyta a kol., 2015).

Migrace je určována chemotaktickými faktory. Jejich vznik je aktivován pomocí komplementu (fragmentu C5a) při vniknutí mikroorganismů do tkáně nebo jsou produkovány mikroorganismy přímo. Tento chemotaxinový signál je zachycen neutrofily v krevním řečišti a také i tkáňovými makrofágy, u kterých je vyvolán pohyb (migrace) ke zdroji (k nejvyšší koncentraci) chemotaktických faktorů. Kde dochází k fagocytóze mikroorganismů (Ferenčík a kol., 2005).



Obrázek 3: Adheze monocytů/makrofágů a jejich následná diapedeze a migrace

(http://vet.uga.edu/ivcvm/courses/VPAT5200/03_inflammation/02_acute/Self_Study_Quiz/Images/Quiz3_ans.jpg)

3.2.6 Procesy makrofágů v imunitě

Makrofágy se přirozeně vyskytují rovněž i v mléčné žláze a jsou společně s neutrofily aktivovány zejména při jejím zánětu. Jejich význam stoupá s relativně častým výskytem zánětů mléčné žlázy skotu. Při zánětu pronikají bakterie nejčastěji skrze strukový kanálek, kde překonají ochrannou bariéru žlázy, a dochází k jejich pomnožení v dutinovém systému žlázy. V této rané fázi jsou důležité mononukleární fagocyty neboli makrofágy, neutrofily a lymfocyty. Tyto krevní elementy mohou zabránit rozvoji následné infekce. Mononukleární fagocyty jsou dominující buňky mléka a zdravé mléčné žlázy a zároveň mohou být iniciátoři zánětlivé odpovědi vůči infekci (Sládek, 2001).

Po migraci monocytů do subendotelové vrstvy krevní cévy jsou monocyty automaticky vychytávány přes tzv. scavengerové receptory, které aktivují buňky a transformují je v tzv. pěnové buňky. Tyto modifikované makrofágy vylučují sekrecí cytokiny a růstové faktory, které se uplatňují při regulaci lokální zánětlivé reakce v mléčné žláze (Horák, 2010).

Při zrání monocytů v makrofágy mléčné žlázy se zvětšuje množství lyzozomů, receptorů pro Fc fragment a imunoglobulin G (IgG) a receptorů pro C3 složku komplementu a zvyšuje se schopnost fagocytózy a opsonizace (povlečení antigenu protilátkami a komplementem). Makrofágy se přemísťují do ohnisek zánětu po 6 - 12hodinách, kde regulují

jeho průběh. Jsou spouštěny zejména bakteriálním lipopolysacharidem (LPS) a interferonem- γ (IFN- γ) (Toman a kol., 2009).

Při kontaktu patogenních mikroorganismů nebo odumřelých buněk s makrofágy usídlených v intersticiu a v serosních dutinách mléčné žlázy dochází k aktivaci makrofágů, kteří jsou schopni nastartovat a koordinovat imunitní procesy a hojení. Aktivaci makrofágů umožňují různé látky (např.: součásti bakterií, cytokiny – interferon γ , atd.). Následně aktivované makrofágy vylučují cytokiny, kterými dále aktivují další buňky imunitního systému (Lüllmann-Rauch, 2012).

Procesy imunitní a procesy hojení probíhají třemi cestami tj.: a) uvolněním cytokinů „svolávají“ neutrofilů a další monocyty/makrofágy; b) spoluprací jak s neutrofilů pomocí fagocytózy zbytků buněk a zničení bakterií, tak i s lymfocyty pomocí prezentace antigenu; c) makrofágy stimulují buňky odpovídající za hojení ran. Pokud makrofágy narazí na objekt, který kvůli jeho velikosti nejsou schopni pohltit, fúzí v mnohjaderné obrovské buňky (buňky cizích těles) (Lüllmann-Rauch, 2012).

Makrofágy mléčné žlázy umožňují aktivní fagocytózu bakterií, buněčného detritu, korpuskulárních komponentů mléka, kaseinových micel a apoptotických neutrofilů. Baktericidní schopnosti jsou omezené na rozdíl od neutrofilů (u skotu mají deficienci myeloperoxidázy). Při vniknutí bakterií do mléčné žlázy se bakterie nebo jejich produkty navazují na receptory, sloužící k nescifickému rozpoznání. Dochází k aktivaci makrofágů a produkci prozánětlivých mediátorů, kteří indukují příliv dalších leukocytů a vývoj zánětu v centru poškození. Po skončení fagocytózy apoptotických neutrofilů dochází k produkci protizánětlivých cytokinů (TGF- β , IL-10) makrofágy. Také je inhibován proces genové transkripce protizánětlivých cytokinů a nastupuje proces rezoluce zánětu (Toman a kol., 2009).

3.2.6.1 Uvolnění cytokinů

Cytokiny jsou proteiny nebo glykoproteiny s nízkou molekulovou hmotností. Vznikají činností buněk různých tkání a orgánů, ale především buněk imunitního systému. Cytokiny slouží k dorozumívání buněk a tvoří tzv. „mezibuněčnou informační síť“. V určitém mikroprostředí se nachází větší množství cytokinů, které se mohou navzájem ovlivňovat (potencovat, inhibovat, vyvolat syntézu dalších cytokinů atd.). Biologická aktivita cytokinů je výsledkem vzájemné aktuální místní koncentrace, typem cílové buňky,

regulačních faktorů, genetickou predispozicí, aktuálním zdravotním stavem jedince, věkem, výživou, pohlavím, léky atd. Cytokiny se rozdělují do tří tříd podle jejich účinků na interferon alfa (INF- α) (antivirový a antiproliferační účinek), interferon gama (INF- γ) (imunostimulační účinek) a interleukiny (IL-2) (stimulace T-buněk). INF- γ je hlavní cytokin imunitní odpovědi. Spolupůsobí v aktivaci cytotoxických T-buněk, NK-buněk a makrofágů (Mladosievičová, 2014).

Dle produkce cytokinů se rozlišují makrofágy do dvou typů, jsou to prozánětlivé M1 a protizánětlivé M2. M1 makrofágy uvolňují cytokiny, které inhibují množení okolních buněk a ničí okolní tkáň. Zatím co M2 makrofágy uvolňují cytokiny, které podporují množení okolních buněk a zachovávají tkáň. Tato polarizace makrofágů M1-M2 je přísně kontrolována řadou signálních drah, transkripcí a posttranskripčními regulačními sítěmi. Nerovnováha polarizovaných makrofágů M1 a M2 je často spojována s různými chorobami nebo se zánětlivými onemocněními. Proto je molekulární identifikace spojená s dynamickými změnami polarizace makrofágů a porozumění jejich interakcí je rozhodující v objasnění molekulárních základů vývoje chorob a vývoji nových terapeutických strategií zprostředkovaných díky makrofágům (Mills a kol., 2015).

3.2.6.2 Fagocytóza

Fagocytóza je proces, při kterém dochází k pohlcení částic větších jak 0,1 μ m. Patří mezi základní mechanismy přirozené imunity, které nelze nahradit (Ferenčík a kol., 2005). Fagocytóza je realizována pomocí čtyř kroků: interakce cizorodého materiálu, jeho internalizace, degradace a exocytóza (Otomar a kol., 2011).

3.2.6.2.1 Interakce

Interakce zahrnuje identifikaci cizorodého materiálu a jeho zadržení fagocytující buňkou (makrofágem). Identifikace je realizována pomocí rozpoznání specifických složek na povrchu fagocytovaného materiálu, který je typický pro poškozené buňky a bakterie. Dále je usnadňována pomocí látek zvaných opsoniny, které se vážou na cizorodý materiál, urychlují (až několikrát) a umožňují jejich identifikaci makrofágům. Tento děj je označován jako opsonizace (Otomar a kol., 2011).

3.2.6.2.2 Internalizace

Po zachycení (vazbě) opsonizovaného materiálu k fagocytu dochází k vychlipování buněčné membrány makrofágu v tzv. pseudopodie, které postupně obklopují materiál

do váčku nazývaného fagozom (Toman a kol., 2009). K igesci neboli k pohlcení dochází při obklopení přilnutého materiálu membránou fága. Po uzavření fagocytovaného materiálu do vnitřního prostoru buňky vzniká fagozom, který se následně spojí s lyzozomem a usmrtí, degraduje či zničí pohlcené částice. Spojení fagozomu s lyzozomem se nazývá fagolyzozom (Rokyta a kol., 2015).

3.2.6.2.3 Degradace

K degradaci materiálu dochází díky prostředí ve fagolyzozomu, které je pro většinu bakterií smrtelně jedovaté. Spojuje dvě varianty antimikrobiálních a cytotoxických látek. Jedna forma vzniká při aktivaci metabolismu kyslíku na počátku fagocytózy (superoxid a peroxid vodíku) a druhá forma pochází z lyzozomů (defenziny – polypeptidy zvané „živočišná“ antibiotika a enzymy) (Ferenčík a kol., 2005). Pomocí spojení těchto dvou forem látek dochází k digesci pohlceného materiálu tzv. oxidačním vzplanutím (Toman a kol., 2009).

3.2.6.2.4 Exocytóza

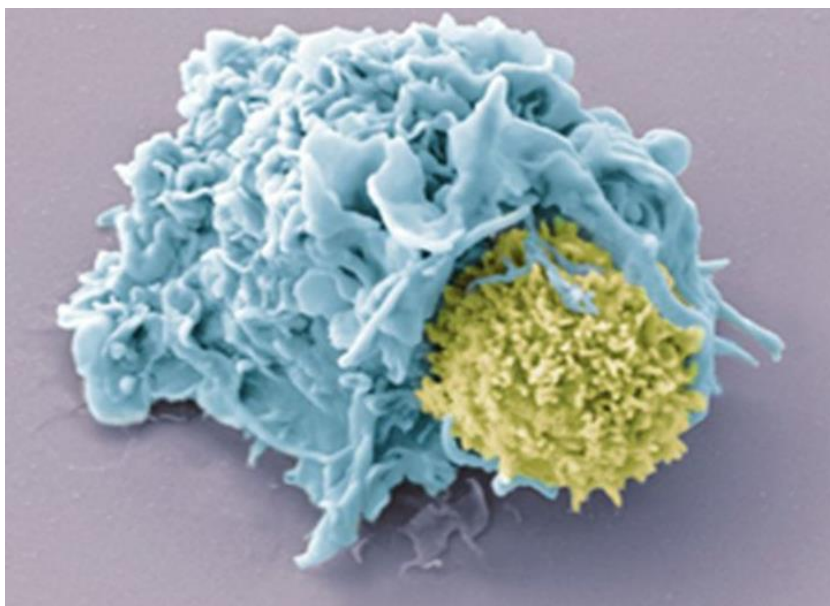
Jeden z mechanismů vylučování buněk je exocytóza. Je to proces, při kterém dochází k fúzi membrán sekrečních váčků s plazmatickou membránou a uvolnění obsahu váčků do extracelulárního prostoru (Lee, 1996). Exocytóza makrofágů je důležitým faktorem ovlivňujícím fagocytózu. Buňky mohou minimalizovat jimi absorbovaný obsah pouze do určitého okamžiku, proto je exocytóza nezbytně vyžadována k vyprázdnění obsahu buňky pro další fagocytózu či pinocytózu. Exocytóza je regulována příjmem kationtu Ca^{2+} . Při nedostatku mediátoru vápníku je exocytóza zastavena (Regazzi, 2008).

3.2.6.3 Stimulace buněk

Stimulace M1 makrofágů je realizována pomocí exprese TLR ligand, jehož výsledkem je zvýšená glykolýza a následná syntéza intracelulární ATP (Rodriguez-Prados a kol., 2010). Makrofágy uvolňují části ATP do extracelulárního prostoru, kde je hydrolyzován na adenosin pomocí ektoenzymů (CD39, CD73) na povrchu makrofágů. Adenosin představuje signál, který indukuje produkci regulačních transkriptů v makrofázích (Biswas a Mantovani, 2014).

Zánětlivá reakce makrofágů je obvykle přechodná. V případě blokády ektoenzymu CD39, makrofágy uvolní větší množství TNF- α a IL-12. Produkce těchto cytokinů je udržována i po odstranění stimulů. To znamená, že regulace makrofágů je upravována

v závislosti na snížení zánětu či zvýšení přežitelnosti hostitele. Tento mechanismus vyjadřuje schopnost makrofágů řídit svoji aktivaci během zánětu (Biswas a Mantovani, 2014).



Obrázek 4: Fagocytující makrofág (<http://slideplayer.cz/slide/2842938/>)

3.3 Apoptóza

Apoptóza je buněčná „programovaná“ smrt buňky, která je poměrně snadno pozorovatelná. Avšak porozumění základnímu procesu je náročné z důvodu složitých interakcí velkého počtu signálních proteinů a probíhajících reakcí na systémové úrovni (Lavrik, 2013). Může k ní docházet jak při fyziologických, tak i patologických stavech. K fyziologickému zániku buněk dochází zejména v embryonálním vývoji, kde zanikají centrální buňky a vzniká zárodek dutinových orgánů. Apoptózou jsou eliminovány i některé nádorové buňky (Mačák a kol., 2012). Apoptóza je i důležitým mechanismem imunitního dohledu, vyvolává usmrcení preneoplastických (nádorových) buněk a buněk infikovaných virem (McQueen, 2010).

Apoptóza je řízena geny, např. antionkogeny. Jestliže dojde k inaktivaci antionkogenů, stane se nádorová populace „nesmrtelná“. Dále může být zahájena pomocí vnějších vlivů, např.: účinkem glukokortikoidů, tepelným šokem, zářením či některými cytokiny (Mačák a kol., 2012).

Dráhy buněčné smrti používají genetické kódování a jejich odvozené součásti přenášejí specifickou smrt – včetně signálů ve společném fenotypu spojených se smrtí. Tyto signály často zahrnují kroky ovlivňující mitochondrie, které iniciují nebo zesilují proces.

Mitochondrie jsou organely, které obsahují složky nerozložených lipidů a proteinů obvykle se vyskytujících v cytosolu. Díky těmto složkám jsou ideálním místem pro specifickou integraci v procesu buněčné smrti. Mitochondrie jsou hlavními producenty energie ATP (adenosin trifosfát), který se podílí na udržení životně důležitých buněčných funkcí (Reed a Green, 2011).

Několik drah apoptózy začíná v mitochondriích, slouží jako prostředek pro zahájení nebo zesilování signalizace buněčné smrti (Reed a Green, 2011).

3.3.1 Strukturální znaky apoptózy

Apoptóza je fyziologický proces odstraňování buněk, oproti mitóze reguluje počet buněk směrem dolů. Apoptózu absolvují jednotlivé buňky odděleně od sousedních buněk. Při apoptóze se buňky zmenšují a prochází typickými změnami jádra a cytoplasmy, které zahrnují kondenzaci chromatinu, rozdělení jádra do laloků a následné rozdělení buňky do velkého počtu povrchových buněčných váčků, tzv. zeotických váčků. Tyto váčky jsou jako apoptotická tělesa fagocytovány sousedními buňkami a makrofágy kde jsou následně degradovány lyzozomy (Coleman a Tsongalis, 2010).

3.3.2 Biochemické znaky apoptózy

Řízení apoptózy je prováděno pomocí četných impulsů, které mohou iniciovat buňky pro zahájení nebo podpoření buněčné apoptózy. Tyto impulsy mohou být odlišné v různých typech buněk a mohou obsahovat glukokortikoidy, tumor necrosis factor α (TNF- α), růstové faktory deprivace, virové proteiny, radiaci a protinádorová léčiva. Některý z těchto impulsů může vyvolat další signály přes různé receptory buněčného povrchu, jako je například TNF- α / nervový růstový faktor ze skupiny receptorů, které zahrnují CD40 a Fas / APO-1. Stejně jako rozšiřující se skupina receptorů, které vážou doménu smrti (Winkler, 2012).

Mezi typické biochemické změny doprovázející proces apoptózy je řazena aktivace kaskády cystein-aspartátových proteáz zvaných kaspázy, které se uvolňují z proapoptických proteinů (cytochrom c) z mitochondrií v cytosolu, degradace deoxyribonukleové kyseliny (DNA), degradace polymeráz a jejich přemístění na vnější stranu lipidové dvojvrstvy plasmatické membrány (Coleman a Tsongalis, 2010).

Mnoho proapoptických signálů směřuje do plasmatické membrány skrze specifické receptory. Ligandy „smrti“ (Fas ligandy) se vážou na odpovídající receptory. Receptory

„smrti“ 4 a 5 a aktivují proapoptické dráhy, při nichž se TNF- α (pleiotropický cytokin) váže na trimerizační receptor TNFR. TNF- α působí prostřednictvím dvou receptorů TNFR1 a TNFR2, které se nachází v různých buňkách. TNFR2 přijímá pouze signály pro přežití, zatímco TNFR1 přijímá jak signály pro „přežití“, tak i signály „smrti“. (Hehl-gans, 2005; McQueen, 2010). Tedy po navázání TNF- α na receptor TNRF dochází k přidružení proteinů a formování takzvaného Komplexu I, následně Komplexu II nebo smrt signalizujícího komplexu DICS. Tyto formy jsou spojeny pomocí ligand zvaných Fas, tedy jsou propojeny s oblastí „smrti“ a prokaspázou 8 (McQueen, 2010). TNF- α je součástí imunitní odpovědi proti mykobakteriím a také působí při aktivaci makrofágů. Zvyšuje produkci cytokinů a nastartuje proces apoptózy (Algood a kol. 2004; Harris a kol., 2008).

Mitochondrie často slouží jako konečná dráha v apoptotické signalizace. Aktivace komplexu DICS a prokaspázy 8 uvede do činnosti kaskádu efektorů. Kaskádu typu I signalizuje aktivovaná kaspáza 8, která přímo aktivuje kaspázu 3. Zatímco kaskáda typu II signalizuje rozštěpení proteinu Bid pomocí kaspasy 3 za účelem jeho zkrácení, který se přemísťuje do mitochondrií, kde vyvolá uvolňování cytochromu c a mitochondriální cestu k apoptóze. Kaspáza 8 může také štěpit Bap31 v endoplasmatickém retikulu na Bap20 a další proapoptické molekuly. K podobným signálům dochází po navázání FasL s receptorem Fas (také nazývaný CD95), a TRAIL s receptory „smrti“ DR4 a DR5 (McQueen, 2010).

3.3.3 Genetické znaky apoptózy

Apoptóza je programovaná buněčná smrt, která zahrnuje řízenou „demontáž“ intracelulárních komponentů, přičemž se zabrání zánětu a poškození okolních buněk (Mcilwain, 2013). Inhibitory proteinů a RNA syntézy jsou schopné pozdržet apoptózu v mnoha buněčných systémech. To znamená, že buňka musí být aktivní i při vlastní smrti, jelikož je třeba syntetizovat nové produkty genové exprese předtím, než může dojít k apoptóze. Některý z těchto výsledných produktů může být specifický pro buněčnou smrt – apoptózu. Geny, které musí být transkribovány a jejich příslušné funkce, představují nyní oblast intenzivního výzkumu (Horton, 2013).

Iničiační kaspázy aktivují kaspázy způsobující konečnou fázi apoptózy neboli smrt (Mcilwain a kol., 2013). Jsou to zejména kaspázy 3 a 7, které koordinují své aktivity, rozkládají strukturální proteiny a aktivují další enzymy. Konečná fáze zahrnuje aktivaci

a degradaci jaderného obalu a cytokeratinů, která napomáhá přestavění jádra, kondenzaci chromatinu a zaoblení buňky. Dále kaspáza 3/7 inaktivuje endonukleázové inhibitory, což vede k aktivaci endonukleáz a fragmentaci internukleosomální DNA. Kaspáza 3/7 ovlivňuje i zmenšení apoptotické buňky, vylučování fosfatidylserinu z buňky a tvorbu zetotických váčků (McQueen, 2010; Mcilwain a kol., 2013).

3.3.4 Osud apoptotických buněk

Apoptóza je druh buněčné smrti, u které je zachována „celková čistota“ během smrti buňky, což je pozitivum pro celý organismus. Je to zvláště důležité u buněk s potenciálně toxickým obsahem. Chrání tak okolní tkáň před uvolněním toxických látek do prostředí a jejich následným poškozením (Horton, 2013). V mléčné žláze je apoptóza makrofágů zapojena do regulace jejich životnosti, zejména nepotřebných buněk (Sládek a Ryšánek, 2010).

Po zahájení apoptotického programu jsou umírající buňky odstraněny z organismu makrofágy. Mohou to být sousední buňky, které fungují jako poloprofesionální fagocyty nebo specializované buňky jako jsou makrofágy (Jacobson a McCarthy, 2002). Příjem a odstranění apoptotických buněk se nazývá proces tzv. efferocytózy. Eliminace buněk podstupující apoptózu zabraňuje uvolňování jejich intracelulárního obsahu do okolní tkáně (Friggeri a kol., 2012). Odstraňování apoptotických buněk je zásadní pro ochranu tkáně před zánětlivým poškozením způsobeným únikem škodlivého obsahu umírajících buněk (Jacobson a McCarthy, 2002).

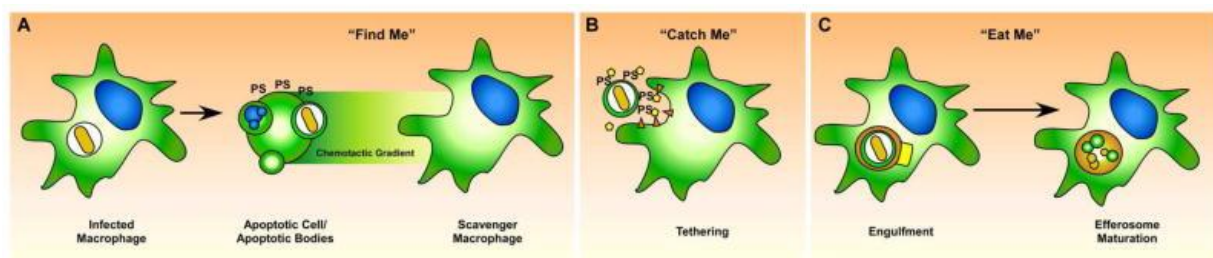
Navíc pohlcením apoptotických buněk se snižují místní záněty pomocí posílení uvolňování protizánětlivých cytokinů a potlačení produkce prozánětlivých mediátorů fagocytárních buněk. Pokud nedojde k rychlému odstranění apoptotických tělísek pomocí efferocytózy, dojde k jejich rozpadnutí a uvolnění intracelulárního obsahu. Tento proces, známý jako sekundární nekróza, vede k zánětu a může přispět k autoimunitě (Martin a kol., 2014).

Spojení apoptotických buněk s fagocytujícími buňkami vyžaduje jejich pohyb nebo anatomickou „blízkost“ cílových a efektorových buněk (Jacobson a McCarthy, 2002). Buňky prodávající apoptózu přetrvávají dostatečně dlouho, aby protein pomocí navázání s enzymem transglutaminázou mohl zabránit časnému rozpadu buněk a mohlo proběhnout rychlé rozpoznání a fagocytování buněk. Rozpoznání je zásadní pro plynulé

a efektivní fungování systému buněčné likvidace. Závisí na změnách povrchu buněk tvořících se v průběhu apoptózy (Horton, 2013).

Fagocyty mohou použít jeden i více rozpoznávacích mechanismů z řady možných pro zneškodnění apoptotických buněk. Na oplátku apoptotické buňky mohou vystavovat jejich stav tzv. "eat me" signály mnoha různými způsoby. Například apoptotické buňky vystaví na svém povrchu řadu různých molekul, které jsou ve zdravých buňkách složkami vnitřního listu lipidové dvojvrstvy, jako je fosfatidylserin, sacharidy N-acetylglukosaminu a jeho dimer NN'- diacetylchitobiosa, vitronektin a fibronectin. Tyto exponované molekuly jsou rozpoznány příslušnými receptory na povrchu makrofágů. Výsledkem rozpoznání je cílený pohyb membrány fagocytů (řízený změnami cytoskeletu), aby obklopil a pohltil cílové buňky a vytvořil fagosom. Po fúzi fagosomu s lyzozomem, vzniká výsledný fagolyzozom a jeho obsah je tráven pomocí kyselého prostředí a enzymů (Jacobson a McCarthy, 2002).

Pohlčení apoptotických buněk efferocytózou se více podobá makropinocytóze. Receptory, které rozpoznávají apoptotické buňky a zprostředkovávají efferocytózu jsou odlišné od těch, které zprostředkovávají fagocytózu (viz níže). Během efferocytosy, aktivita RhoA je potlačena a Rac1 koordinuje činnost pohlčení apoptotických váčku a vznik útvaru podobnému fagosomu, jež je nazýván efferozomem, který obklopuje nově pohlčené apoptotické buňky (Obrázek 5). Zatímco nové GTPázy jsou identifikovány a způsobují zrání efferozomu, konečný výsledek je podobný fagocytóze. Fúze lyzozomů zajišťuje hydrolytické enzymy pro zrání efferozomu. Dochází k jeho postupné acidifikaci, které vede nakonec ke zničení apoptotické buňky (Martin a kol., 2014).



Obrázek 5: Mechanismus efferocytózy (Martin a kol., 2014)

Bylo identifikováno šest genů, které jsou nezbytné pro fagocytózu apoptotických buněk. Kódovaný CED-7 protein má sekvenci podobnou ABC (ATP-binding cassette) transportérům, které jsou známé přepravou různých substrátů přes membrány. CED-7 je

široce exprimován v průběhu embryogeneze a je lokalizován na plazmatické membráně. Analýza ukazuje, že je zapotřebí jeho funkce v umírajících a fagocytovaných buňkách. Základem je jeho biochemická funkce, to znamená, že CED-7 se může účastnit rozpoznávání umírajících a fagocytovaných buněk pomocí přemístění se za tzv. „eat me“ signály a následně vytvořit spojení mezi jejich receptory (Jacobson a McCarthy, 2002).

Apoptotické makrofágy jsou fyzicky eliminovány z mléčné žlázy fagocytózou dalších makrofágů (Sládek a Ryšánek, 2010). Efektivní odstranění apoptotických buněk pomocí fagocytózy je předpokladem pro udržení tkáňové homeostázy, stejně jako imunitní odpověď na poranění či zánět (Erwig a Henson, 2008). Studie na myších a lidech ukazují, že rychlé odstranění umírajících buněk je velmi důležité pro imunitní toleranci a udržení tkáňové homeostázy. Neúspěšné nebo defektní odstranění apoptotických buněk se ukazuje jako důležitý faktor přispívající k řadě chorobných procesů (Elliott a Ravichandran, 2010). Poškozené buňky umírají apoptózou a tiše odstraní fagocytární buňky s minimálními zásahy do běžných činností organismu (Zong a Thompson, 2006).

3.4 Nekróza

Mnoho stresorů a stimulů způsobuje buněčnou smrt, která může probíhat dvěma způsoby – apoptózou (výše popsanou) a nekrózou. Nekróza je patologický proces probíhající ve tkáni nebo v orgánu. Nekróza je typický výsledek akutního nebo razantního narušení metabolismu jako je např. ischemie. Ta byla pozorována zejména v tkáňových řezech, tudíž je považována spíše za výsledek než proces. Termín onkóza označuje proces vedoucí k nekrotické smrti (Coleman a Tsongalis, 2010).

Homeostáza organismu závisí na složité rovnováze mezi buněčnou smrtí a obnovou. Raní patologové si uvědomovali, že tato rovnováha by mohla být narušena rozsáhlým poškozením vnitřních orgánů v průběhu některých chorob. Tato forma poškození tkání byla nazvána „nekróza“, odvozená od řeckého slova „*nekros*“, znamenající mrtvola. Nekróza byla používána k popisu patologické buněčné smrti. Až do nedávné doby, nekrotická buněčná smrt byla považována za následek zranění, kdy buňka umírající nekrózou byla spatřována jako oběť vnějších událostí, které nemohla ovlivnit. Nicméně, nedávné důkazy naznačují, že buňka může zahájit svůj vlastní zánik nekrotickou smrtí, který iniciuje jak zánětlivě a/nebo reparační odpovědi v hostiteli. Zahájením této adaptivní reakce, programovaná buněčná nekróza může sloužit k udržování tkání a integrity organismu (Zong a Thompson, 2006).

Nekróza může zahrnovat jednu nebo velmi malé skupiny buněk, a je obvykle iniciována poškozením buněčné membrány, které iniciuje tvorbu váčků, jejich následné prasknutí a vyloučení obsahu buňky do extracelulárního prostoru. Ohnisko nekrózy je rozpoznatelné pomocí skupiny odumřelých buněk. V dalších případech poškození buněčné membrány vede ke ztrátě buněčné vody s přetrváváním odumřelých buněk bez jádra nebo s pyknotickým jádrem. Tyto acidofilní části jsou vyloučeny do tkáňového prostoru, kde mohou být fagocytovány makrofágy (Keppler, 2012).

Nekróza se může dělit na nekroptózu, nekrózu a sekundární nekrózu, avšak jsou si velice podobné (Berghe a kol., 2010). Nekroptóza je nazývána programovanou nekrozou, která probíhá regulovaně (Vandenabeele a kol., 2010).

Programovaná buněčná nekróza může být důsledkem extracelulární signalizace, nebo může být zahájena formou buněčné „sebevraždy“ v reakci na intracelulární poruchu. Nekrotická buněčná smrt se nejspíše vyvinula, aby mohla v mnohobuněčných organismech zastávat systém včasného varování, kde rozpoznává a přizpůsobuje se událostem, které by mohly ohrozit celistvost organismu jako celku. Programovaná buněčná nekróza hraje roli v celé řadě chorobných procesů, včetně neurodegenerativních onemocnění, infekcí, zánětlivých chorob (mastitid), styku s toxiny a rakovinou (Zong a Thompson, 2006).

3.4.1 Strukturální znaky nekrózy

Buněčné změny vedoucí k nekrotické buněčné smrti zahrnují pohyb plasmatické membrány ve výčnělky zvané váčky, zvětšování mitochondrií, otok endoplasmatického retikula, disociace polyribosomů a zvětšování buňky vedoucí k prasknutí a uvolnění intracelulárního obsahu (Coleman a Tsongalis, 2010).

Pro nekrotickou buněčnou smrt jsou charakteristické tyto histologické znaky: ztráta tvaru, vakualizace, karyolýza a zvyšující se eosinofilie. Lýza buněk vyvolává zánětlivou reakci. Způsobuje „přitahování“ neutrofilů a monocytů do mrtvé tkáně za účelem likvidace nekrotických buněk fagocytózou a zabránění vzniku infekce. V orgánech s malou regenerační schopností jako jsou srdce, mozek a mléčná žláza dochází k hojení jizev přeměnou nekrotických oblastí na kolagen a další složky pojivové tkáně. V orgánech jako jsou játra, které mají silné regenerační schopnosti může buněčná proliferace nahradit odumřené části za zcela normální tkáň během několika dní. Ve vyléčené jaterní tkáni

se vyskytuje pouze malá část reziduí či žádná. V případě, že regenerace selže, dochází k ukládání kolagenu a fibrózy a může docházet až ke vzniku cirhózy (Coleman a Tsongalis, 2010).

Nekroptóza, nekróza a sekundární nekróza tedy představují po apoptóze různé způsoby buněčné smrti, jejichž změny v buněčné morfologii jsou podobné včetně zaoblení buňky, otoků cytoplazmy, protržení plasmatické membrány a vylití intracelulárního obsahu (Berghe a kol., 2010).

3.4.2 Biochemické znaky nekrózy

Základním rysem, který odlišuje většinu forem nekrózy před apoptózou je rychlá ztráta buněčných membránových potenciálů. Neschopnost udržovat tyto elektrochemické potenciály má za následek otoky cytoplazmy, protržení plasmatické membrány a cytolýzu. Tato ztráta membránových potenciálů může být důsledkem vyčerpání buněčné energie, poškození membránových lipidů, a/nebo ztráty funkce homeostázy iontových čerpadel (kanálů). Tyto defekty mohou působit synergicky při indukcii nekrotické buněčné smrti. Například defektní produkce ATP a/nebo nadměrné spotřeby ATP může vést k poklesu funkce ATP-dependentních iontových pump na plasmatické membráně. Perturbace (porucha) intracelulární iontové homeostázy může mít za následek mitochondriální dysfunkci a snížení produkce ATP. Často je obtížné určit, zda ztráta produkce ATP nebo narušení funkce kanálu nastane dříve (Zong a Thompson, 2006).

Subcelulární reakce probíhají během působení tumor nekrotizujícího faktoru (TNF- α) (indukující nekroptózu), H₂O₂ (indukující nekrózu) a anti-Fas (indukující sekundární nekrózu). Fáze buněčného rozpadu z těchto tří typů nekrózy jsou charakterizovány totožnými subcelulárními změnami včetně oxidativního vzplanutí, mitochondriální membránové hyperpolarizace, permeabilizace lyzozomální a plasmatické membrány, i když s různými kinetiky. Nekróza indukovaná H₂O₂ začíná okamžitě permeabilizací lyzozomů. Naproti tomu, při TNF- α zprostředkovávající nekroptózu a anti-Fas indukující sekundární nekrózu, je tato změna provedena v pozdější fázi, předchází ji definované signalizační fáze. Indukce nekroptózy pomocí TNF- α závisí na receptoru interagujícím s proteinem kinázou 1, mitochondriálním komplexem I a cytosolovými fosfolipázami A2 aktivity, zatímco nekrózy indukované H₂O₂ potřebují železo, na kterém je závislá Fentonová reakce (Syntichaki a Tavernarakis, 2002; Berghe a kol., 2010).

Typickým biochemickým znakem buněčné smrti je modulace mitochondriálního transmembránového potenciálu (MTP). Snížení mitochondriálního membránového potenciálu je raný děj v apoptóze, avšak při TNF- α indukované nekroptóze byl zaznamenán mitochondriální transmembránový potenciál zvýšený. Nekrotická buněčná smrt vykazuje mitochondriální hyperpolarizaci, i když s různou kinetikou (Berghe a kol., 2010).

K permeabilizaci lyzozomální membrány (LPM) dochází při nekroptóze a nekróze. Permeabilizace lyzozomální membrány byla označena jako klíčový děj v průběhu nekrózy. Lyzozomální integrita (celistvost) je narušena až v konečných fázích při nekroptóze, zato u nekrózy je narušena na počátku (Golstein a Kroemer, 2007; Berghe a kol., 2010).

Nekroptóza a nekróza se vyznačují nízkým bodem tání mitochondriální hyperpolarizace a oxidativního vzplanutí, ale vyskytují se s různými kinetiky. Apoptóza je podmíněna fází signalizace kaspázy a fází zániku, během které jsou apoptotické buňky rychle rozpoznány a pohlceny fagocyty. Při absenci fagocytární schopnosti, apoptotické buňky podstupují sekundární nekrózu, která se vyznačuje stejnými vlastnostmi nekrotické buněčné smrti. Sekundární nekróza, podobně jako primární nekróza, se vyznačuje oxidativní a mitochondriální hyperpolarizací s nízkým bodem tání (Berghe a kol., 2010).

3.4.3 Genetické znaky nekrózy

SMAC mimetika indukují apoptózu společně s TNF- α spouští tvorbu kaspázy-8, která aktivuje komplex obsahující receptor interagující s proteinem kinázou-1 (RIPK1). Inhibitory kaspázy blokují tuto formu apoptózy u mnoha typů buněk. Nicméně v několika dalších buněčných liniích, inhibitory kaspázy přepnou apoptotickou odpověď na nekrózu. Vyšetření siRNA genomu odhalilo další členy kinázových rodin RIP a RIP3, které mají být nutnými složkami pro nekrotickou smrt. Expres RIP3 v různých buněčných liniích koreluje s jejich schopností reagovat na indukci nekrózy. Kinázová aktivita RIP3 je nezbytná pro realizaci nekrózy. Po indukci smrti jsou následně RIP3 odváděny do RIPK1, za účelem vytvoření komplexu vyvolávající nekrózu. RIP3 je klíčový pro nekrotickou smrt v reakci na rodiny TNF- α (cytokiny indukující smrt) (HE a kol., 2009).

Zahájení apoptózy probíhá za permeabilizace vnější mitochondriální membrány (MOMP), což umožní uvolnění apoptogenu. Na rozdíl od apoptózy při primární nekróze dochází k časnému otevření mitochondriálních pórů přechodnou propustností (MPTP),

k urychlení mitochondriální dysfunkce a zastavení syntézy ATP. Proteiny Bax a Bak z genové rodiny Bcl-2 jsou hlavními aktivátory MOMP a apoptózy. Absence Bax / Bak činí buňky odolné proti MPTP a směřuje k nekróze. Data ukazují, že fúze řízené Bax proteinem snižují citlivost pro MPTP otevírání a nekrózu. Proto proteiny Bax a Bak hrají významnou roli v buněčné smrti, a mohou být optimálními terapeutickými cíli pro léčbu nemocí, které zahrnují obě formy buněčné smrti (Whelan, 2012).

3.4.4 Osud nekrotických buněk

Po nekrotické smrti charakterizované svými histologickými znaky, ztrátou tvaru, ztrátou vakualizace a karyolýzou dochází ke zvýšené eosinofilii. Prasknutí buňky evokuje zánětlivou reakci přitahující neutrofile a monocyty k odumřelé tkáni, aby zničili odumřelé části buněk fagocytózou, a tak chránili organismus proti infekci (Coleman a Tsongalis, 2010).

Za nepříznivých podmínek, buňky umírají více „dramatickým“ způsobem a vyvolávají hostitelskou reakci varování a aktivují nervový a imunitní systém. Při rychlém uvolnění intracelulárních molekul do extracelulárního prostředí přes porušené plazmatické membrány může nekrotická buněčná smrt sloužit k vyvolání imunitní odpovědi (Zong a Thompson, 2006).

Z imunostimulačních molekul byl nejvíce studován protein chromatinu HMGB1, který je exprimován ve všech eukaryotických buňkách. I když funkce stabilizace nucleozomální formace může působit jako transkripční regulátor, působí také jako prozánětlivá molekula, která se uvolní do extracelulárního prostředí při nekróze (Scaffidi a kol., 2002). Extracelulární HMGB1 je ligand vázající se na receptory makrofágů. Tato vazba aktivuje produkci zánětlivých molekul a antiapoptotických cytokinů (Lotze a Tracey 2005).

Kromě prozánětlivé odpovědi intracelulárních molekul se uvolňují další molekuly jako je od hepatomu odvozený růstový faktor (HDGF), který se uvolňuje v průběhu nekrózy a může sloužit k aktivaci signálních drah, které podporují růst axonů i neuritů v poškozené oblasti. Také může také indukovat migraci buněk i nádorových metastázových buněk, tento jev je spojen se špatnou prognózou nekrotických oblastí pevných (celistvých) nádorů (Zong a Thompson, 2006).

Buňky umírající nekrotickou smrtí mohou iniciovat prozánětlivé signální kaskády, které aktivně uvolňují zánětlivé cytokiny pomocí vylití jejich obsahu při lýze buňky.

Rozpletení signálních kaskád, které přispívají k nekrotické buněčné smrti může umožnit vyvinout nástroje specificky interferující s nekrózou v určitých úrovních signalizace. Nekróza se vyskytuje jak ve fyziologických, tak v patofyziologických procesech, kde je schopna usmrcovat nádorové buňky, jejichž vyvinutí jim umožňuje se vyhnout apoptóze (Festjens a kol., 2006).

Indukce nekrotické buněčné smrti, může být velmi důležitá například při virové nebo bakteriální infekci. Apoptóza buněk hostitele je potlačena pomocí některých virů kódujících inhibitory kaspázy. Tedy za těchto okolností bude indukce nekrotické buněčné smrti aktivovat přirozené a adaptivní imunitní reakce, které jsou rozhodující pro přemožení infekce a podpoření uzdravení hostitele. Na druhé straně, neefektivní odstranění odumřelých buněk může přispět k šíření patogenu, poškození tkání a všeobecné infekci (Festjens a kol., 2006; Zong a Thompson, 2006).

Při detailnějším rozluštění na kaspázách nezávislých drah „smrti“ nám může pomoci vyvinout nové léčebné varianty pro prevenci buněčné smrti při neurodegenerativních a nádorových onemocnění, zvládnání patogenních infekcí a různých jiných aplikacích (Festjens a kol., 2006).

3.5 Porovnání apoptózy a nekrózy

V mnoha variantách apoptózy je permeabilizace mitochondrií uvolněním cytochromu c společná cesta vedoucí ke konečné fázi. Při stimulaci apoptózy ji mohou indukovat stejné faktory, mohou způsobit vyčerpání ATP a navodit nekrózu. Nekróza je důsledkem mitochondriální dysfunkce (nedostatečné tvorby ATP). Společné cesty, které vedou k různým způsobům buněčné smrti představují nekroptózu (nebo aponekrózu). Obecně platí, že apoptóza je pro organismus lepší variantou buněčné smrti, protože apoptóza podporuje rychlou likvidaci buněk. Zatímco nekrotická buněčná smrt uvolní buněčné složky do extracelulárního prostoru, které mohou indukovat zánět a rozšířit poranění tkáně. Směs nekrózy a apoptózy se vyskytuje v mnoha patofyziologických případech (Coleman a Tsongalis, 2010).

Apoptóza a nekróza představují významné události v patogenezi. Porozumění mechanismům buněčné smrti je základem účinných zásahů buď pro zabránění buněčné smrti jako příčiny onemocnění nebo pro podpoření buněčné smrti v chemoterapii rakoviny či mastitidy (Coleman a Tsongalis, 2010).

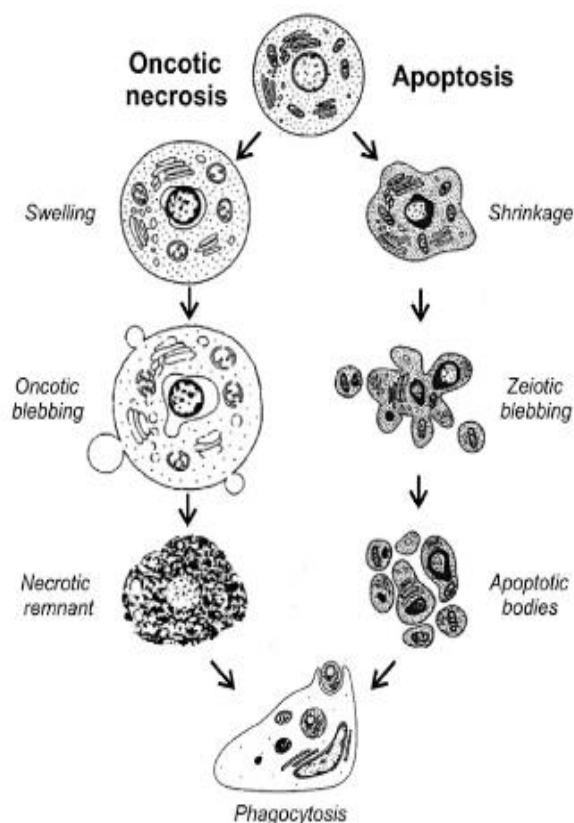
Tabulka 1 - Porovnání apoptózy a nekrózy (Coleman a Tsongalis, 2010)

Apoptóza	Nekróza
Kontrolovaná buněčná smrt	Náhodná buněčná smrt
Jednotlivé buňky oddělené od ostatních	Poškozené oblasti buněk
Buněčné smrštění	Otok buněk
Zeiotické váčky obsahující velké organely	Plazmatické váčky bez organel
Kondenzace a složení jádra	Malé chromatinové celky
Degradace mezinukleozomální DNA	Nepravidelná degradace DNA
Rozpad do apoptotických tělísek	Prasknutí buňky a uvolnění intracelulárního obsahu
Absence zánětu a zjizvení	Záněty a zjizvení
Propustnost mitochondrií	Otok mitochondrií a ztráta jejich funkce
Aktivace kaspázy	Aktivace fosfolipáz a proteáz
Nepřetržitá syntéza ATP a proteinů	Vyčerpávání ATP a narušení metabolismu
Nedotčená plasmatická membrána	Buněčná smrt vyvolána prasknutím plasmatické membrány

Jak již bylo uvedeno výše, byly identifikovány některé charakteristické rysy nekrózy. Patří mezi ně mitochondriální depolarizace a vyčerpání intracelulárního ATP, narušení homeostázy Ca^{2+} , aktivace nonapoptotických proteáz a nakonec narušení plasmatické membrány. Téměř všechny tyto události jsou vzájemně propojeny a regulovány. Apoptóza a nekróza může být často zahájena v reakci na stejné typy poškození v různém množství nebo intenzitě. Tyto vlastnosti mají jasný biologický význam.

V takovém případě je nutné eliminovat nejen buňky podstupující nekrózu, ale rovněž buňky apoptotické. Zatímco nekróza představuje pro organismus nebezpečí poškození tkáně, apoptóza se „nese“ v duchu rychlého a bezpečné eliminace bez prozánětlivého účinku (Zong a Thompson, 2006).

Na druhé straně, zánětlivá odpověď způsobená nekrotózou, může mít zřejmě adaptivní význam (tj. vznik silné imunitní reakce) za určitých patologických stavů (jako je rakovina a infekce). Na druhé straně, poruchy rovnováhy mezi nekrotózou a apoptózou mohou být klíčovým prvkem ve vývoji některých onemocnění (Proskuryakov a Konoplyannikov, 2003).



Obrázek 6: Schéma nekrotózy a apoptózy (Coleman a Tsongalis, 2010)

Apoptóza i nekrotóza makrofágů mléčné žlázy hraje roli nejen u makrofágů v tzv. steady stage stavu (mimo zánět), ale rovněž během zánětlivé reakce. Proto následuje stručné pojednání o zánětu mléčné žlázy skotu a roli makrofágů v průběhu tohoto patofyziologického procesu.

3.6 Zánět mléčné žlázy

Pochopení imunitního systému mléčné žlázy má zásadní význam pro vytváření a rozvíjení opatření kontroly mastitidy (Rainard a Riollet, 2006). Zánět mléčné žlázy neboli mastitida patří mezi velmi významné a ekonomicky závažné onemocnění krav ale i ovcí a koz. Jedná se o polyfaktoriální onemocnění s interakcí mezi jedincem, prostředím a patogenem. Důsledkem tohoto masivně rozšířeného onemocnění je: předčasné vyřazení

laktujících plemenic ze stáda, nižší intenzita selekce jalovic (kvůli nutnému nahrazování brakovaných krav), horší zpeněžování mléka (snížení ekonomické efektivity), zvýšené náklady na veterinární služby a léčiva, snížení dlouhověkosti stáda a rentability farmy (Staněk, 2014; Montoya, 2016).

Zánětlivá reakce mléčné žlázy, je obvykle způsobena mikrobiální infekcí. Snižuje produkci mléka přibližně na 70 %. Poškozením tkáně mléčné žlázy se snižuje počet a aktivita epiteliálních buněk, což následně přispívá ke snížení produkce mléka. Poškození tkáně bylo prokázáno, že je indukováno buď apoptózou nebo nekrózou. Tyto 2 odlišné typy buněčné smrti mohou být rozlišovány podle morfologických, biochemických a molekulárních změn v umírajících buňkách. Jak bakteriální hostitelské faktory, tak imunitní reakce přispívá k poškození epitelu tkáně. Během infekce mléčné žlázy může být poškození tkáně zpočátku způsobeno bakteriemi a jejich produkty. Některé bakterie produkují toxiny, které ničí buněčné membrány a poškozují tkáň mléčné žlázy, zatímco jiné bakterie jsou schopny napadnout a pomnožit se v rámci epiteliálních buněk mléčné žlázy, než způsobí buněčnou smrt. Kromě toho, mastitida se vyznačuje zvýšeným počtem somatických buněk, především polymorfonukleárních neutrofilů a makrofágů, v mléčné žláze. Se zvýšenou migrací imunitních buněk do mléčné žlázy a porušením bariéry mezi krví a mlékem dochází k většímu poškození epitelu mléčné žlázy. Je dobře známo, že odbourávání extracelulární matrix může vést k odumření epiteliálních buněk. Mezitím polymorfonukleární neutrofilů a makrofágy mohou poškodit mléčnou tkáň tím, že uvolňují reaktivní meziprodukty kyslíku a proteolytických enzymů. In vitro a in vivo studie naznačují, že použití antioxidantů a dalších ochranných látek v kontrolních programech mastitidy prokazuje, že mohou pomoci při zmírňování poškození sekrečních buněk, a tím snížit následné ztráty mléka (Zhao a Lacasse, 2008).

Přirozená imunita je velmi široká oblast pro výzkum, a to i přes desítky let trvajících zájmu. Naše současné znalosti o vrozené obranyschopnosti mléčné žlázy jsou stále neúplné. Předmětem výzkumu se stávají např. epiteliální buňky mléčné žlázy, které jsou významné pro lokální obranu a mobilizaci leukocytů. Tím mléčná žláza představuje vhodný model pro studie přirozené imunity na úrovni epitelu – výstelky mléčných tubo-alveol, kde je předmětem výzkumu interakce bakterií způsobujících mastitidu, jako jsou *Escherichia coli* nebo *Staphylococcus aureus* (Rainard a Riollot, 2006; Sheet a kol., 2016).

Nové „výkonné“ vědecké nástroje radikálně modifikovaly vyhlídky na pochopení souhry mezi mléčnou žlázou a její vrozenou imunitou v interakci s bakteriemi způsobujícími mastitidu. Genetická analýza imunitní odpovědi, microarray genové technologie, transkriptomická metodika a umlčování genů pomocí RNA interference pomohou objevit několik klíčových obranných mechanismů, kterými se řídí citlivost k mastitidám na molekulární a genetické úrovni. To by pak umožnilo zvýšit odolnost mléčné žlázy přežvýkavců vůči mastitidám skrze imunomodulaci a genetické „vylepšování“ (Rainard a Riollet, 2006).

Makrofágy jsou hlavním typem buněk v mléce. Mléčné makrofágy jsou fagocytující buňky, které mohou pohltnout běžné patogeny mastitid. Jsou méně aktivní než neutrofilové. Makrofágy mléčné žlázy i neutrofilové jsou méně účinné než jejich protějšky v krvi. I když přímá obranná role mléčných makrofágů je zpochybňována, jsou potenciálními antigen prezentujícími buňkami, dále jsou zapojeny do detekce napadajících patogenů a iniciace zánětlivé odpovědi. Tyto děje mohou představovat jejich základní funkci jako efektorů přirozené imunity. Funkční schopnosti makrofágů mléčné žlázy se výrazně snižují během období kolem porodu, a s tím je spojen zvýšený výskyt mastitid (Rainard a Riollet, 2006).

Majoritními fagocytárními buňkami mléčné žlázy skotu jsou vedle makrofágů rovněž polymorfonukleární neutrofilní leukocyty (neutrofilové). Tyto buňky tvoří první obrannou linii proti napadajícím patogenům. Ochrana je účinná pouze v případě rychlé migrace neutrofilů z krevního řečiště (Paape a kol., 2002). I když se jejich baktericidní kompetence zdá být omezená, aktivně fagocytují, což ukazuje, že jsou schopny bakterie rozpoznat. Zejména receptory opsoninů (IgG1, IgG2) byly potvrzeny na mléčných makrofázích. Makrofágy jsou stimulovány lipopolysacharidy (LPS) *E. coli* a reagují vylučováním interleukinů (IL-1). Makrofágy u skotu exprimují gen, který produkuje protein CD14. Ten se ukládá na povrchu membrány jako mCD14 nebo se vyloučí do okolí. "Rezidentní" neutrofilové by se mohly také podílet na signalizaci bakteriálních elementů, i když tato signalizace nebyla prokázána. Oba typy buněk mohou uvolňovat chemotaktické a zánětlivé mediátory, které vyhledají a rozpoznají bakterie (Paape a kol., 2002; Rainard a Riollet, 2006).

Klíčovou součástí v antimikrobiální aktivitě aktivovaných makrofágů je indukce oxidu dusnatého syntázy (iNOS). Tento komplex enzymů katalyzuje přeměnu argininu na citrulin a oxid dusnatý (NO), na vysoce reaktivní radikál. Oxid dusnatý reaguje buď

s kyslíkem za vzniku dusitanů (NO_2) a dusičnanů (NO_3), nebo s baktericidní peroxynitri-tem za interakce s peroxidem. Koncentrace oxidu dusnatého je v mlezivu i ve zralém mléce od zdravých krav velmi nízká. Produkce oxidu dusnatého se přechodně zvyšuje v mléce po infuzi lipopolyproteinu *E. coli*, avšak oxid dusnatý se uvolňuje ve vyšších množstvích a po delší dobu, jestliže jsou infikovány čtvrtě mléčné žlázy bakteriemi *E. coli* nebo *S. aureus*. Bylo prokázáno, že mléčné leukocyty uvolní oxid dusnatý po stimulaci bakteriálními produkty, jako jsou lipopolysacharidy (LPS) nebo stafylokokové enterotoxiny. Makrofágy se pravděpodobně podílejí na hlavní části produkce oxidu dusnatého z mléčných leukocytů, protože makrofágy skotu jsou dobrými producenty oxidu dusnatého po stimulaci lipopolysacharidy, na rozdíl od neutrofilů. Makrofágy mléčné žlázy skotu jsou také schopné vylučovat oxid dusnatý po stimulaci složek gram-pozitivních bakterií za pomoci stimulace cytokinů, jako jsou IFN- γ (Rainard a Riollet, 2006).

Indukce iNOS v mléčné tkáni je stimulována lipopolysacharidy (LPS) a TNF- α . Zvýšené koncentrace oxidu dusnatého, lze nalézt v mléce zvířete trpící mastitidou. Tyto výsledky ukazují, že oxid dusnatý hraje roli v patofyziologii mastitidy, ale okamžik, kdy oxid dusnatý přispívá k antibakteriální ochraně nebo k poškození mléčné tkáně, není popsán (Rainard a Riollet, 2006).

Druhá obranná linie proti infekci obsahuje síť paměťových buněk a uvolněných imunoglobulinů, které interagují s první obrannou linií. Účelem této interakce je minimalizace poškození tkáně mléčné žlázy, které je způsobeno toxiny bakterií a oxidačními produkty neutrofilů. Čím rychlejší je tato reakce, tím je poškození tkáně menší (Paape a kol., 2002).

3.7 Apoptóza makrofágů mléčné žlázy skotu

V současné době je zřejmé, že poškození tkáně mléčné žlázy při zánětu je způsobeno rovněž nekrotickým rozpadem neutrofilů. Proto je nutné, aby tyto buňky podstoupily apoptózu a byly zlikvidovány fagocytózou makrofágů (Sládek a Ryšánek, 2001).

Jakou však hraje apoptóza, popř. nekróza roli u makrofágů mléčné žlázy? Je třeba zmínit, že se v současné době v literatuře vyskytuje velmi málo prací, které pojednávají o roli apoptózy u makrofágů mléčné žlázy skotu. Tato oblast tedy není náležitě prostudována.

V mléčné žláze skotu je přítomná tzv. rezidentní populace makrofágů. Tyto buňky mají strukturální podobu krevních monocytů, anebo jsou vakuolizované, což je následek jejich tzv. scavenger funkce (Wardley et al., 1976). Přičemž tato kategorizace je významná, protože obě populace buněk podléhají v jiné míře apoptóze.

Detekce apoptózy u nevakuolizovaných makrofágů probíhá jen v malém množství, protože jsou mladými buňkami v porovnání s makrofágy (Leinter a kol., 2003). Avšak tyto buňky neodolávají apoptóze, protože ta zachovává homeostázu (Liacos a kol., 2008). Studie dokazují, že tyto buňky *in vitro* jsou „apoptotizovány“ do 24 hodin bez poskytnutí stimulů (Sládek a kol., 2010). Nevakuolizované formy makrofágů podstupují apoptózu méně než vakuolizované makrofágy. Dále rezidentní makrofágy podstupují apoptózu častěji než zánětlivé makrofágy. Apoptóza makrofágů vykazuje dynamiku v souvislosti s průběhem zánětlivé reakce mléčné žlázy. Během iniciace se podíl apoptózy minimalizuje a v rezoluci dochází k jeho nárůstu, jelikož nevakuolizované makrofágy se mění na vakuolizované nejdříve po pěti dnech po migraci. Bylo zaznamenáváno zvýšené procento apoptózy u populace vakuolizovaných makrofágů (Sládek a Ryšánek, 2010). Lze pozorovat obdobné děje jak u makrofágů mléčné žlázy, tak i u makrofágů v lidských plicích. Jelikož v mikroprostředí alveolárních zdravých plic je zvýšená apoptóza alveolárních makrofágů, za účelem zachování homeostázy tkáně plic (Liacos a kol., 2008).

Bylo prokázáno, že vakuolizované zánětlivé makrofágy jsou „apoptotizovány“ ve větší míře než nevakuolizované makrofágy. Jak už bylo popsáno výše fagocytóza neutrofilů je úzce spojena s apoptózou makrofágů. Bylo prokázáno, že lokálně apoptotizované makrofágy obsahují fagocytované apoptotické buňky během zánětu. Odstranění těchto apoptotických makrofágů pak ovlivňuje to, jestli bude ukončení zánětu úspěšné (Sládek a kol., 2010).

4 ZÁVĚR

Onemocnění mléčné žlázy skotu mohou vznikat při infekcích nebo nesprávném zacházení se zvířaty. Změny zdravotního stavu tohoto vysoce exploatovaného orgánu se promítají do produkce mléka, počtu somatických buněk atd. Zánět mléčné žlázy – mastitis – se promítá rovněž do celkového zdravotního stavu dojnice.

Vzhledem k tomu, že se jedná o jedno z nejčastějších onemocnění, je logická snaha o jeho minimalizaci. Proto se poznatky výzkumu dostávají rychle do praxe s cílem nalézt co nejvíce účinnou a rychlou léčbu. Vedle toho je nutné si uvědomit, že je důležitá nejen eliminace patogenů pomocí obranného systému mléčné žlázy a aplikované léčby, ale rovněž restrukturalizace poškozené tkáně. Tato rezoluce zánětu pak zahrnuje procesy spojené s apoptózou buněk obranného systému, která představuje bezpečný a rychlý způsob eliminace buněk zánětu.

Právě apoptóza, oproti nekróze, se může podílet na zkrácení zánětu, zejména chronických, a tím se potenciálně podílet na zlepšení všech ukazatelů s tím spojených.

Do budoucna by se měl tedy výzkum orientovat mimo jiné na procesy, související s indukci a ovlivněním apoptózy buněk obranného systému mléčné žlázy skotu v období rezoluce zánětu tohoto orgánu.

5 ZDROJE

- ALGOOD H.M., LIN P.L., YANKURA D., JONES A., CHAN J, FLYNN J.L. *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
- BERGHE, T. V., et al. *Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features*. Cell Death & Differentiation, 2010, 17.6: 922-930.
- BISWAS S. K. and MANTOVANI A. *Macrophages: Biology and role in the pathology of diseases*, EBL-Schweitzer, Springer New York, 2014. ISBN 978-14-939-1311-4.
- BROIDE, D. *Buňky zánětu. Základní a klinická imunologie*. 1987, č.9
- COLEMAN W. B. and TSONGALIS G. J., *Essential concepts in molecular pathology*, Elsevier Science, 2010. ISBN 978-00-809-2218-8.
- ERWIG, L. P.; HENSON, P. M. *Clearance of apoptotic cells by phagocytes*. Cell Death & Differentiation, 2008, 15.2: 243-250.
- ELLIOTT, M. R.; RAVICHANDRAN, K. S. *Clearance of apoptotic cells: implications in health and disease*. The Journal of cell biology, 2010, 189.7: 1059-1070.
- FERENČÍK M., a kolektiv. *Imunitní systém: Informace pro každého*. Praha: Grada Publishing, 2005. ISBN 978-80-247-6740-6.
- FESTJENS, N.; BERGHE, T. V.; VANDENABEELE, P. *Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics, 2006, 1757.9: 1371-1387.
- FRIGGERI, A., et al. *Extracellular histones inhibit efferocytosis*. Molecular medicine, 2012, 18.5: 825.
- GOLSTEIN, P.; KROEMER, G. *Cell death by necrosis: towards a molecular definition*. Trends in biochemical sciences, 2007, 32.1: 37-43.
- HAFERLACH, T., U. BACHER a H. THEML. *Kapesní atlas hematologie*. Praha: Grada Publishing, 2014. ISBN 978-80-247-4787-3.

- HARRIS J., HOPE JC., KEANE J. *Tumor necrosis factor blockers influence macrophage responses to Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Infections. 2008; 198:1842–50.
- HE, Sudan, et al. *Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF- α* . Cell, 2009, 137.6: 1100-1111.
- 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.
- HORÁK J., a kolektiv. *Hemochromatóza*. Praha: Grada Publishing a.s., 2010. ISBN 978-80-247-6385-9.
- HOŘEJŠÍ V. a J. BARTUŇKOVÁ. *Základy imunologie*. 4. vyd. Praha: Triton, 2009. ISBN 978-80-7387-280-9.
- HORTON M. A. *Macrophages and related cells*, Blood Cell Biochemistry, Springer US, 2013. ISBN 9781475795349.
- JACOBSON M. D. a N. J. MCCARTHY. *Apoptosis*. New York: Oxford University Press, 2002. ISBN 9780199638499.
- KEPPLER D., *Pathogenesis and mechanisms of liver cell necrosis*, Springer Netherlands, 2012. ISBN 978-94-011-6618-8.
- LAVRIK, N. I. *Systems biology of apoptosis*. 1. New York, NY: Springer, 2013. ISBN 1461440092.
- LEE, A.G. *Endocytosis and Exocytosis*. Burlington: Elsevier, 1996. ISBN 0080530885.
- 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., KONSTADOUKAKIS, MM., ECONOMOU, C., KATASARAGAKIS, S., CHATZIGIANNI, 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.

LOTZE M.T. and TRACEY, K.J. *High-mobility group box 1 protein (HMGB1): Nuclear weapon in the immune arsenal.* Nat. Rev. Immunol, 2005, 5: 331–342

LÜLLMANN-RAUCH, R. *Histologie.* Přeložil R. ČIHÁK. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-3729-4.

MAČÁK J., a kolektiv. *Patologie: 2., doplněné vydání.* 2. Praha: Grada Publishing, 2012. ISBN 978-80-247-7770-2.

MARTIN, C. J.; PETERS, K. N.; BEHAR, S. M. *Macrophages clean up: efferocytosis and microbial control.* Current opinion in microbiology, 2014, 17: 17-23.

MARVAN, F. a A. HAMPL. *Morfologie hospodářských zvířat.* Vyd. 5. Praha: Vydala Česká zemědělská univerzita v Praze v nakl. Brázda, 2011. ISBN 978-80-213-2188-5.

MCILWAIN, David R.; BERGER, Thorsten; MAK, Tak W. *Caspase functions in cell death and disease.* Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2013, 5.4: a008656.

McQUEEN. *Comprehensive toxicology.* 2nd ed. Oxford: Elsevier, 2010. ISBN 9780080468846.

MILLS C.D., LENZ L.L. and LEY K. *M1/m2 macrophages: The arginine fork in the road to health and disease.*, Frontiers Research Topics, Frontiers Media SA, 2015. McQueen, C. *Comprehensive toxicology*, Elsevier Science, 2010. ISBN 978-00-804-6884-6

MLADOSIEVIČNOVÁ B. a kolektiv, *Kardioonkologie: 2., přepracované a doplněné vydání*, Grada Publishing, a.s., 2014. ISBN 978-80-247-9231-6

MONTOYA, J. F. G. *Milking Management and Teat Level Risk Factors Related to Mastitis.* 2016. PhD Thesis. The University of Wisconsin-Madison.

OTOMAR K., a kolektiv. *Lékařská fyziologie.* Praha: Grada Publishing, 2011. ISBN 978-80-247-9528-7.

OTOVÁ, B. a R. MIHALOVÁ. *Základy biologie a genetiky člověka*. V Praze: Karolinum, 2012. ISBN 978-80-246-2109-8.

OTOVÁ, B., M. KOHOUTOVÁ a A. PANCZAK. *Lékařská biologie a genetika*. Praha: Karolinum, 2014. ISBN 978-80-246-2415-0.

PAAPE, M., et al. *Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes*. Journal of mammary gland biology and neoplasia, 2002, 7.2: 109-121.

PANCZAK A., OTOVÁ, B. (ed.). *Lékařská biologie a genetika*. Praha: Karolinum, 2013. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 978-80-246-2415-0.

PENKA M. a E. TESAŘOVÁ a kolektiv. *Hematologie a transfuzní lékařství I: Hematologie*. Praha: Grada Publishing, 2011. ISBN 8024771926.

PROSKURYAKOV, S. Y., KONOPLYANNIKOV, A. G., GABAI, V. L. *Necrosis: a specific form of programmed cell death?*. Experimental cell research, 2003, 283.1: 1-16.

RAINARD P. and RIOLLET, C. *Innate immunity of the bovine mammary gland*. Veterinary research, 2006, 37.3: 369-400.

REECE W. O. *Fyziologie a funkční anatomie domácích zvířat*. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3282-4.

REED J.C. and GREEN D.R., *Apoptosis: Physiology and pathology*, Cambridge University Press, 2011. ISBN 978-11-394-9873-9

REGAZZI, R. *Molecular mechanisms of exocytosis*. Austin, Tex: Landes Bioscience, Eurekah.com, 2008. ISBN 978-03-873-9961-4.

RODRIGUEZ-PRADOS J.C., TRAVES P.G., CUENCA J., RICO D., ARAGONES J., MARTIN-SANZ P., CASCANTE M., BOSCA L. (2010) *Substrate fate in activated macrophages: a comparison between innate, classic, and alternative activation*. J. Immunol 185:605-6014

ROKYTA R., a kolektiv. *Fyziologie a patologická fyziologie: pro klinickou praxi*. Praha: Grada Publishing a.s., 2015. ISBN 978-80-247-9902-5.

ROVENSKÝ J., a kolektiv. *Revmatologický výkladový slovník*. Praha: Grada Publishing, 2006. ISBN 978-80-247-6293-7.

SCAFFIDI P., MISTELI, T., and BIANCHI, M.E. *Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation*. *Nature*, 2002, 418: 191–195.

SHEET, O. H., et al. *Development and validation of a loop mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the detection of Staphylococcus aureus in bovine mastitis milk samples*. *Molecular and Cellular Probes*, 2016, 30.5: 320-325.

SLÁDEK and RYŠÁNEK, *Apoptosis of resident and inflammatory macrophages before and during the inflammatory response of the virgin bovine mammary gland*, *Acta Veterinaria Scandinavica* 52, 2010, no. 1, 12. DOI: 10.1186/1751-0147-52-12.

SLÁDEK, Z. *Apoptóza neutrofilních granulocytů mléčné žlázy skotu*. Brno, 2001. Habilitační práce. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita.

STANĚK, *Mastitidy*. In: ZOOTECHNIKA [online]. Dostupné z: <http://www.zootechnika.cz/clanky/zaklady-chovatelstvi/zoohygiena-a-choroby-hospodarskych-zvirat/choroby-prezvykavcu/mastitidy.html>, 2014 [cit. 2016-10-27].

SYNTICHAKI, P. and TAVERNARAKIS, N. *Death by necrosis*. *EMBO reports*, 2002, 3.7: 604-609.

TOMAN, M. *Veterinární imunologie*. 2., dopl. a aktualiz. vyd. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-2464-5.

VANDENABEELE, P., et al. *Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion*. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2010, 11.10: 700-714.

WARDLEY, R.C., ROUSE, R.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.

WHELAN, R. S., et al. *Bax regulates primary necrosis through mitochondrial dynamics*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, 109.17: 6566-6571.

WINKLER, J. *Apoptosis and Inflammation*. Basel: Birkhäuser Basel, 2012. ISBN 9783034887410.

ZHAO, X.; LACASSE, P. *Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control*. Journal of animal science, 2008, 86.13_suppl: 57-65.

ZONG, W.; THOMPSON, C. B. *Necrotic death as a cell fate*. Genes & development, 2006, 20.1: 1-15.

6 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Vývoj krevních elementů z kmenové buňky	14
Obrázek 2: Morfologie monocytu a makrofágu	15
Obrázek 3: Adheze monocytů/makrofágů a jejich následná diapedeze a migrace ..	17
Obrázek 4: Fagocytující makrofág	21
Obrázek 5: Mechanismus efferocytózy	25
Obrázek 6: Schéma nekrózy a apoptózy	33

7 SEZNAM ZKRATEK

ABC	ATP binding cassette
anti-Fas	antigen Fas
APO-1	apoptosis antigen 1
ATP	adenosin trifosfát
Bax	proapoptotický protein
Bak	proapoptotický protein
Bid	proapoptotická molekula
Bap31	proapoptotická molekula
Bap20	proapoptotická molekula
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Ca ²⁺	kationt vápenatý
CD73	cluster of differentiation 73
CD39	cluster of differentiation 39
CD40	cluster of differentiation 40
CED-7	transportní protein
DICS	death inducing signaling complex
DNA	deoxyribonukleonová kyselina
DR4	receptor smrti
DR5	receptor smrti
FasL	Fas ligand
GTPázy	GTP fosfohydroláza
H ₂ O ₂	peroxid vodíku

HMGB1	high mobility group box 1
HDGF	hepatoma-derived growth factor
INF- α	interferon- α
IFN- γ	interferon- γ
IgG	imunoglobulin G
IL-1	interleukin-1
IL-2	interleukin-2
IL-10	interleukin-10
IL-12	interleukin-12
iNOS	inducible nitric oxide synthase
LPM	lysosomal membrane permeability
LPS	lipopolysacharid
mCD14	membránová forma proteinu CD14
MOMP	mitochondrial outer membrane permeabilization
MPTP	mitochondrial permeability transition pore
MTP	mitochondrial transport proteins
NK-buňky	natural killer cell
NO	oxid dusnatý
NO ₂	dusitany
NO ₃	dusičnany
RIP	receptor-interacting protein kinase
RIP3	receptor-interacting protein kinase 3
RIPK1	receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1

RNA	ribonukleová kyselina
siRNA	small interfering RNA
TGF- β	transforming growth factor β
TLR	Toll-like receptor
TNF	tumor necrosis factor α
TNFR	tumor necrosis factor receptor