

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A BIOCHEMICKÝCH VĚD

ERYPTÓZA
BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

AUTOR PRÁCE: Zuzana Nováková

VEDOUCÍ PRÁCE: doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.

2019

UNIVERSITY OF PARDUBICE
FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL SCIENCES

ERYPTOSIS
BACHELOR THESIS

AUTHOR: Zuzana Nováková

SUPERVISOR: doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.

2019

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Zuzana Nováková**
Osobní číslo: **C16266**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Název tématu: **Eryptóza**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**


Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

- 1) Zpracujte literární rešerši zaměřenou na téma eryptózy, jako buněčné smrti erytrocytů. V bakalářské práci se nejprve zaměřte na obecný popis stavby erytrocytů, jejich funkci a vlastností. Dále uveďte různé možnosti smrti erytrocytů, včetně popisu role RES při hemolýze. V poslední části práce se zaměřte na uvedení detailního popisu nově popsaneho děje zvaného eryptóza, včetně detailního popisu průběhu, signalizace, možností ovlivnění, atd.
- 2) Ke zpracování kompilace využijte elektronických vědeckých databází, jako jsou např. *ScienceDirect*, *HighWire*, *NCBI Pubmed*, *apod.*

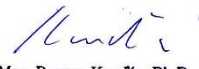
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**
Seznam odborné literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **21. prosince 2018**
Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2019**


prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.


prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2019

Čestné prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci na téma „Eryptóza“ vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a zdroje, které jsem v této práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že 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 směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 1. 7. 2019

Zuzana Nováková

Poděkování:

Tímto bych ráda poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce doc. RNDr. Tomáši Roušarovi, Ph.D. za odborné vedení mé práce, za vstřícný přístup a čas při konzultacích, věcné připomínky a cenné rady, které mi při zpracování práce poskytl. Dále bych také ráda poděkovala své rodině za podporu po dobu studia.

Anotace

Tato bakalářská práce popisuje zánik erytrocytů eryptózou, ale i jiné způsoby zániku červených krvinek. V úvodní části jsou stručně popsány obecné vlastnosti erytrocytů, stavba jejich buněčné membrány a vznik erytrocytů (= erytropoéza). V druhé kapitole je popsána stavba a funkce retikuloendotelové soustavy, která je pro zánik erytrocytů nezbytná. Další kapitola popisuje různé způsoby zániku erytrocytů, mezi které patří odstraňování senescentních erytrocytů pomocí makrofágů (= erytrofagocytóza), nekróza a apoptóza, a programovaná buněčná smrt erytrocytů, zvaná eryptóza. Eryptóza zaujímá největší část bakalářské práce. V první části této podkapitoly je podrobně vysvětlen mechanismus eryptózy a v tabulkách jsou popsány stimulatory a inhibitory tohoto procesu. Ve druhé části je uveden její fyziologický a patologický význam, protože porucha regulace této formy buněčné smrti vyvolává mnohá onemocnění.

Klíčová slova

Erytrocyty; apoptóza; eryptóza; makrofágy; vápník.

Annotation

This bachelor thesis describes the erythrocyte's death, eryptosis, but also other types of the red blood cells. In the introductory part of this thesis are described briefly the general properties of erythrocytes, the construction of their cell membrane and the formation of erythrocytes (i.e. erythropoiesis). The second chapter describes the structure and function of the reticuloendothelial system which is essential for cell death. Next chapter describes various ways of erythrocyte's death, including the removal of senescent erythrocytes by macrophages (i.e. erythrophagocytosis), necrosis and apoptosis, and programmed death of erythrocytes, called eryptosis. The largest part of the bachelor thesis has been focused on the description of eryptosis. In the first part of the subchapter, the mechanism of eryptosis is explained in detail and stimulators and inhibitors of this process are described in the tables. The second part presents its physiological and pathological significance because the failure of the eryptosis regulation can cause a number of diseases.

Key words

Erythrocytes; apoptosis; eryptosis; macrophages; calcium.

OBSAH

ÚVOD.....	14
1. ČERVENÉ KRVINKY.....	15
1.1 Definice a význam	15
1.2 Stavba erythrocytární membrány	15
1.3 Erytropoéza	17
2. RETIKULOENDELOVÁ SOUSTAVA.....	19
2.1 Stavba a funkce	19
3. ZPŮSOBY ZÁNIKU BUNĚK.....	20
3.1 Proces senescence – stárnutí erytrocytů.....	20
3.1.1 Erytrofagocytóza.....	20
3.1.2 Signalizační látky pro erytrofagocytózu	21
3.2 Nekróza buněk.....	22
3.3 Programovaná buněčná smrt (apoptóza)	24
3.3.1 Kaspázy	27
3.3.2 Bcl-2.....	28
3.3.3 Vnitřní a vnější cesta apoptózy	29
3.3.3.1 Vnitřní cesta apoptózy	29
3.3.3.2 Vnější cesta apoptózy	30
3.4. Eryptóza	30
3.4.1 Mechanismus eryptózy.....	32
3.4.2 Fyziologický význam eryptózy	35
3.4.3 Patologický význam eryptózy	35
3.4.3.1 Diabetes mellitus.....	36
3.4.3.2 Chronické onemocnění ledvin.....	36
3.4.3.3 Hemolytický uremický syndrom	36
3.4.3.4 Wilsonova choroba	37
3.4.3.5 Nedostatek železa a malignity	37
3.4.3.6 Srpkovitá anémie, β -talasémie, deficit G6PD	37
3.4.3.7 Malárie	38
3.4.3.8 Paroxysmální hemoglobinurie, myelodysplastický syndrom	38
3.4.3.9 Mutace GLUT1	39
3.4.3.10 Deplece fosfátů	39

4. ZÁVĚR.....	40
5. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	41

SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKU A TABULEK

Obrázky

Obrázek 1: Výměna fosfolipidů přes buněčnou membránu	16
Obrázek 2: Inhibice a aktivace fagocytózy	22
Obrázek 3: Schéma nekrózy a apoptózy	23
Obrázek 4: Apoptóza	27
Obrázek 5: Vnější a vnitřní cesta apoptózy	29
Obrázek 6: Fagocytóza	31

Tabulky

Tabulka I: Inhibitory apoptózy	25
Tabulka II: Induktory apoptózy	25
Tabulka III: Stimulátory eryptózy	34
Tabulka IV: Inhibitory eryptózy	34

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AE1	Aniontový výměník 1 (<i>Aniont exchanger 1</i>)
AIF	Apoptózu-indukující faktor (<i>Apoptosis-inducing factor</i>)
Apaf-1	Apoptotická proteáza aktivující faktor 1 (<i>Apoptotic protease activating factor 1</i>)
Bad	Bcl-2 asociovaný promotor buněčné smrt (<i>Bcl-2 associated death promoter</i>)
Bak	Bcl-2 homologní antagonist/zabiják (<i>Bcl-2 homologous antagonist/killer</i>)
Bax	Bcl-2 asociovaný X protein (<i>Bcl-2 associated X protein</i>)
Bcl-2	B-buněčný lymfom 2 (<i>B-cell lymphoma 2</i>)
Bcl-XL	B-buněčný lymfom extra velký (<i>B-cell lymphoma extra large</i>)
BH	Bcl-2 homologie (<i>Bcl-2 homology</i>)
Bik	Bcl-2 působící na smrt (<i>Bcl-2 interacting killer</i>)
Bmf	Bcl-2 modifikující faktor (<i>Bcl-2 modifying factor</i>)
Bok	Bcl-2 příbuzný zabíjecí protein vaječníků (<i>Bcl-2 related ovarian killer protein</i>)
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cGMP	Cyklický guanosinmonofosfát
DISC	Signalizační komplex indukující smrt (<i>Death inducing signaling complex</i>)
ETB	Receptor endotelu B (<i>Endothelin B receptor</i>)
FADD	Fas-asociovaná smrtící doména (<i>Fas-associated death domain</i>)
FasL	Fas ligand
G6PD	Glukóza-6-fosfátdehydrogenáza
GLUT1	Glukózový transportér 1 (<i>Glucose transporter 1</i>)
IgG	Imunoglobulin G
Mcl-1	Indukovaný protein myeloidní leukemické buňky (<i>Myeloid cell leukemia-1</i>)
PAF	Faktor aktivující destičky (<i>Platelet activating factor</i>)
PGE2	Prostaglandin E2
Puma	p53-upregulovaný modulátor apoptózy (<i>p53-upregulated modulator of apoptosis</i>)

RNS	Reaktivní druhy dusíku (<i>Reactive nitrogen species</i>)
ROS	Reaktivní druhy kyslíku (<i>Reactive oxygen species</i>)
SIRP α	Signální regulační protein α (<i>Signal regulatory protein α</i>)
TNF	Tumor nekrotizující faktor (<i>Tumor necrosis factor</i>)
TRADD	TNFR-asociovaná smrtící doména (<i>TNFR-associated death domain</i>)
TSP-1	Trombospondin 1 (<i>Thrombospondin 1</i>)

ÚVOD

Červené krvinky jsou bezjaderné elementy bikonkávního tvaru patřící mezi nejdůležitější složky krve. Obsahují krevní barvivo, zvané hemoglobin, pomocí kterého přenáší krevní plyny (kyslík a oxid uhličitý). Erythrocyty vznikají v červené kostní dřeni z krvetvorných kmenových buněk v procesu zvaném erythropoéza. Žijí přibližně 120 dní. Odbourávány jsou v retikuloendotelovém systému, především ve slezině.

Zestárlé (senescentní) erythrocyty podléhají morfologickým změnám a jsou odstraněny z krevního oběhu pomocí makrofágů. V průběhu života jsou buňky poškozovány vlivem vnějších a vnitřních podnětů, a proto jsou odstraňovány apoptózou nebo nekrózou. Výsledkem apoptózy je vznik apoptotických tělísek, která jsou pohlcena makrofágy bez vzniku zánětu. Výsledkem nekrózy je uvolnění cytosolového obsahu buňky do okolí a vznik zánětu. Jestliže dochází k odstraňování poškozených erythrocytů z krevního oběhu, jedná se o programovanou smrt zvanou eryptóza. Ta je stimulována a inhibována dle typu působících látek. Následkem dysregulace eryptózy dochází ke vzniku mnoha závažných onemocnění.

TEORETICKÁ ČÁST

1. ČERVENÉ KRVINKY

1.1 Definice a význam

Lidská červená krvinka je jedinečná. Během svého vývoje ztratila nejen jádro, ale také organely jako jsou mitochondrie, Golgiho aparát a endoplazmatické retikulum s ribozomy. Životnost červených krvinek je 100-120 dní. Erytrocyty mají morfologicky bikonkávní tvar, který se může měnit při průchodu kapilárami a slezinovými endoteliálními sinusoidami (*Mohandas, 1989*). Jejich tloušťka je 2,5 μm na periférii a 0,8 μm uprostřed. Normální počet erytrocytů v periferní krvi je u mužů $4,3-5,3 \cdot 10^{12}/\text{l}$ a u žen $3,8-4,8 \cdot 10^{12}/\text{l}$.

Nejvíce zastoupenou stavební složkou erytrocytů je hemoglobin. Hemoglobin je metaloprotein, který se skládá ze 4 podjednotek, dvou alfa (α) a dvou beta (β). Každou podjednotku tvoří bílkovinná část (globin) a nebílkovinná část (hem). Globin se skládá ze čtyř polypeptidů a hem je tvořen protoporphyrinem IX s centrálním atomem železa Fe^{2+} . Hlavním úkolem hemoglobinu je přenos dýchacích plynů (O_2 , CO_2) mezi plícemi a tkáněmi. Mezi další významné funkce erytrocytů patří regulace pH krve, udržování viskozity krve a ochrana před reaktivními druhy kyslíku a dusíku (ROS, RNS).

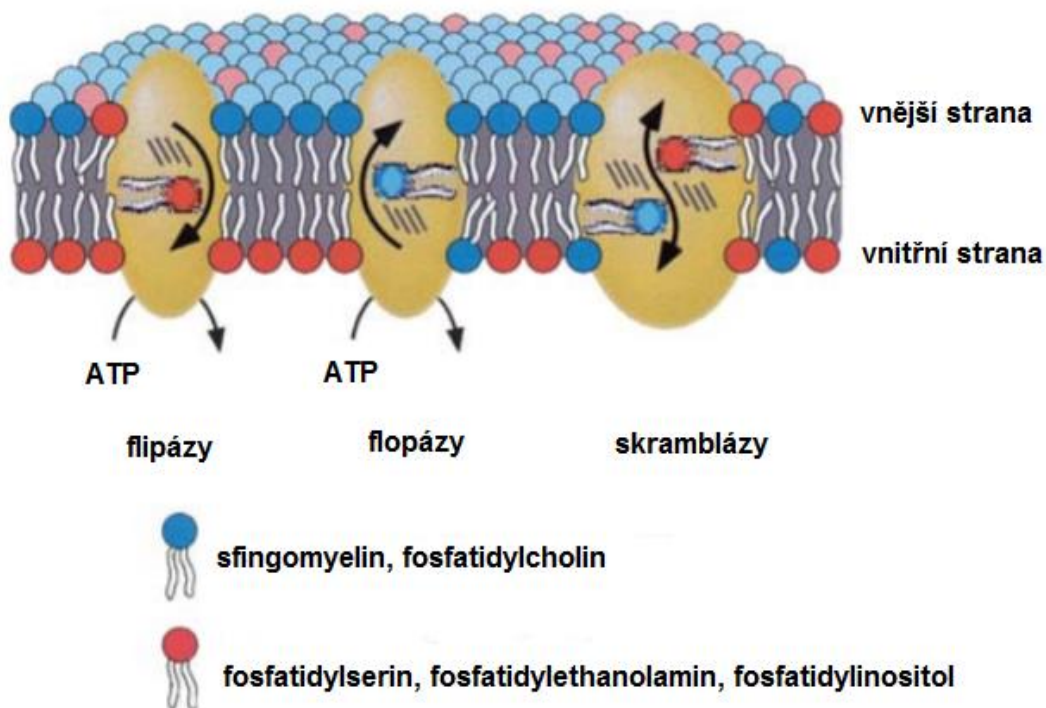
Metabolismus erytrocytů je jedinečný vzhledem k absenci mitochondrií. Jako hlavní zdroj energie využívají D-glukózu. 90 % glukózy je přeměno anaerobní glykolýzou na ATP. Zbývá 3 % D-glukózy jsou zpracována pentózovým cyklem, při kterém vzniká koenzym $\text{NADPH}+\text{H}^+$, který je nezbytný pro syntézu glutathionu. Glutathion chrání erytrocyty před účinky oxidačního stresu.

1.2 Stavba erytrocytární membrány

Na povrchu červených krvinek se nachází složitá plazmatická membrána, která je propustná pro vodu a elektrolyty. Tato membrána má unikátní vlastnosti: deformovatelnost při průchodu kapilárami, elasticitu, schopnost okamžité odpovědi na změnu povrchového napětí kapaliny, pevnost a odolnost.

Membrána erytrocytů je složena z dvojvrstvy lipidů. Tato dvojvrstva odděluje intracelulární a extracelulární prostor a obsahuje zakotvené integrální transmembránové proteiny a lipidy. Proteiny (flotiliny, stomatiny, G proteiny, β -adrenergní receptory) a lipidy (cholesterol, sfingolipidy) tvoří specializované oblasti, tzv. rafty, které se společně zapojují do fyziologických procesů (Pretorius, 2016).

Hlavní podíl z membránových lipidů tvoří fosfolipidy, glykolipidy a cholesterol. Zatímco cholesterol je rovnoměrně rozmístěn mezi lipidovou dvojvrstvou, fosfolipidy jsou uspořádány asymetricky. Na vnější straně erytrocytů je lokalizován sfingomyelin a fosfatidylcholin, zatímco na vnitřní straně se nalézají fosfatidylethanolamin, fosfatidylserin a fosfatidylinositol (Mohandas, 2008). V membráně se také nacházejí 3 druhy lipidových transportérů: flipázy, flopázy a skramblázy. Flipázy transportují fosfolipidy z vnější strany membrány na vnitřní a flopázy působí opačně. Skramblázy jsou zodpovědné za obousměrný transport fosfolipidů (obr. 1) (Zwaal, 2005).



Obrázek 1: Výměna fosfolipidů přes buněčnou membránu (Zwaal, 2005).

Integrální transmembránové proteiny společně s fibrilárními proteiny tvoří pevnou oporu pro tvar červených krvinek. Fibrilární proteiny tvoří síť pod membránou. V plazmatické membráně jsou zakotvené různé druhy proteinů: skeletální proteiny (α -spektrin, β -spektrin, aktin, tropomyozin, tropomodulin, proužek 4.1), kotvicí proteiny (protein 4.2, ankyrin) a integrální proteiny (antigeny, glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenáza, aquaporin, glykoforin C, aniontový transportér) (Yawata, 2003). Pod lipidovou dvojvrstvou leží cytoskeletální síť tvořená spektrinem (Petit, 2019). Spektrin je přítomen ve formě tetramerů, které jsou spojeny aktinovými vlákny a vytváří komplexy. Tetramery se skládají z heterodimerů, které obsahují α -spektrinová a β -spektrinová vlákna (LI, 2012).

Kromě lipidů a proteinů se uvnitř membrány vyskytují také receptory a efekторы, díky kterým může buňka reagovat na změny ve svém okolí. Dále je prostoupena proteinovými vysoce selektivními kanály a pumpami, které umožňují import a export látek (Alberts, 1998).

1.3 Erytropoéza

Erytropoéza, tvorba červených krvinek, probíhá u dospělého člověka v červené kostní dřeni hematopoetických orgánů (např. lebka, obratle, žebra, pánevní kost či sternum). Erytropoéza je ovlivněna řadou látek, jakou jsou erythropoetin, železo, vitamín B₁₂ a interleukin 3 a 4. Erythropoetin je hormon uvolňující se při hypoxii v ledvinách a extracelulární tkáni a zabraňuje apoptóze erytrocytárních progenitorových buněk stimulací produkce antiapoptotického proteinu Bcl-XI, podporuje tvorbu erytroblastů z erytrocytárních progenitorových buněk a inhibuje sebevražednou smrt zralých erytrocytů (Lang, 2012b). Na zvyšování produkce nových erytrocytů se také podílí testosteron, hormony štítné žlázy a růstový hormon (Lang, 2012b). Vývoj erytrocytů trvá 7 dní. Tento proces začíná diferenciací pluripotentních hematopoetických kmenových buněk. Z těchto buněk vznikají dvě linie multipotentních buněk lymfoidního a myeloidního charakteru. Z myeloidních buněk vzniká proerytroblast, jehož jádro s jadérky zaujímá většinu objemu buňky. Charakteristické je perinukleární projasnění a bazofilní cytoplazma bez přítomnosti granul. Proerytroblast se dále dělí na bazofilní normoblast. V tomto stádiu začíná syntéza hemoglobinu. Z bazofilního normoblastu vzniká polychromatofilní normoblast. Zde dochází

ke změně barvy cytoplazmy z bazofilní na amfifilní a buňka se zmenšuje. Z polychromatofilního normoblastu se vyvíjí ortochromatický normoblast, jehož cytoplazma je eozinofilní a dochází zde k vyloučení jádra, které je následně fagocytováno makrofágy a vzniká retikulocyt. Uvolňování retikulocytů do krevního oběhu je stimulováno katecholaminy a za 24-48 hodin se přemění na zralé erytrocyty.

2. RETIKULOENDOTELOVÁ SOUSTAVA

2.1 Stavba a funkce

Retikuloendotelová soustava (mononukleární fagocytární systém) je soubor imunitních buněk, který zahrnuje tkáňové makrofágy a cirkulující krevní monocyty (*Viehmann, 2018*). Monocyty se primárně nacházejí v krevním oběhu, kostní dřeni a slezině. Poté se přemění na makrofágy, které jsou přítomné ve všech tkáních lidského těla, např.: Kupfferovy buňky v játrech, alveolární makrofágy v plicích, histiocyty v pojivové tkáni, osteoklasty v kostní tkáni, nebo mikroglie v mozku (*Chow, 2011*). Do této soustavy byly později zařazeny i dendritické buňky, které jsou považovány za oddělenou linii (*Viehmann, 2018*).

Tento systém zajišťuje homeostázu organismu a jeho hlavní funkce je především fagocytóza buněk, eliminace a prezentace antigenů, destrukce starých nebo poškozených červených krvinek a podíl na metabolismu železa. Tkáňové makrofágy, jako buňky prezentující antigen, chrání organismus před patogeny a odstraňují mrtvé nebo poškozené buňky. Také tvoří a uvolňují biologicky aktivní látky – cytokiny, složky komplementu, cytotoxické látky, chemokiny, deriváty kyseliny arachidonové, erythropoetin, reaktivní druhy kyslíku a dusíku. Dendritické buňky se zaměřují na antigenní prezentaci T-buňkám (*Chow, 2011*).

3. ZPŮSOBY ZÁNIKU BUNĚK

U zdravých jedinců je životnost cirkulujících erytrocytů po jejich uvolnění do krevního oběhu 100-120 dní. Po uplynutí této doby podstupují senescenci (proces stárnutí) a jsou fagocytovány buňkami retikuloendotelové soustavy. Erytrocyty během svého přirozeného stárnutí mohou být poškozeny různými vnějšími a vnitřními vlivy, což ohrožuje jejich integritu, funkci a přežití. Následkem toho mohou podstoupit sebevražednou buněčnou smrt nazývanou eryptóza.

3.1 Proces senescence – stárnutí erytrocytů

V průběhu stárnutí erytrocyty podléhají morfologickým změnám, jako je změna objemu, hustoty, velikosti a tvaru, které vedou k jejich zániku. Na senescenci se podílí i kvalitativní a kvantitativní změny na jejich povrchu, které jsou způsobeny oxidačním stresem a vezikulací. Kromě toho se snižuje aktivita metabolismu i množství enzymů a ATP. Výsledkem těchto změn je ztráta schopnosti erytrocytů se deformovat a následkem toho dochází k membránovému poškození (*Bosman, 2005*).

Na antigeny stárnoucích erytrocytů se váží autologní protilátky IgG. Tyto IgG umožňují rozpoznávat senescentní erytrocyty makrofágům a tím dojde k fagocytóze (erytrofagocytóze) (*Bosman, 2005*).

3.1.1 Erytrofagocytóza

Odstraňování zestárlých nebo poškozených červených krvinek z krevního oběhu probíhá erytrofagocytózou pomocí makrofágů sleziny, jater a kostní dřeně. Tyto makrofágy rozeznají zestárlé červené krvinky pomocí jejich senescentních markerů a ty jsou následně pohlceny. Během tohoto procesu dochází k hemolýze, tj. k protržení membrány a uvolnění intracelulárního obsahu erytrocytů a využití jejich nitrocelulárního obsahu (*Gottlieb, 2012*).

Uvolněný hemoglobin je rozštěpen enzymem hemoxygenázou, který je syntetizován v makrofázích, na hem a globin. Aminokyseliny z globinu putují do aminokyselinového poolu, tj. souhrnu všech aminokyselin v těle. Z těchto aminokyselin se poté tvoří nové proteiny v procesu zvaném proteosyntéza. Železo z hemu se vrací zpět do krevního oběhu pomocí glykoproteinu zvaného transferin. V případě nadbytku železa dojde k jeho ukládání do zásob ve formě

feritinu či hemosiderinu, nebo se vrací zpět do kostní dřeně, kde z něho vznikají nové erythrocyty. Protoporfyrin IX je rozštěpen a vzniká biliverdin, který je následně biliverdinreduktázou redukován na hlavní degradační produkt katabolismu hemu, bilirubin. Bilirubin je špatně rozpustný ve vodě a v krvi musí být transportován ve vazbě na albumin. Kvůli své špatné rozpustnosti se nenachází v moči. Bilirubin vázaný na albumin putuje do jater, kde se konjuguje pomocí glukuronidázy s kyselinou glukuronovou. Vzniká konjugovaná rozpustná forma, která se dostává spolu se žlučí do střeva. Zde dojde k dekonjugaci a střevní bakterie tuto formu redukují na urobilinogen a sterkobilinogen. Část urobilinogenu je resorbována do krve a dostává se do moči. Zbytky urobilinogenu a sterkobilinogenu jsou přeměny na sterkobilin a urobilin, které jsou následně vyloučeny stolicí.

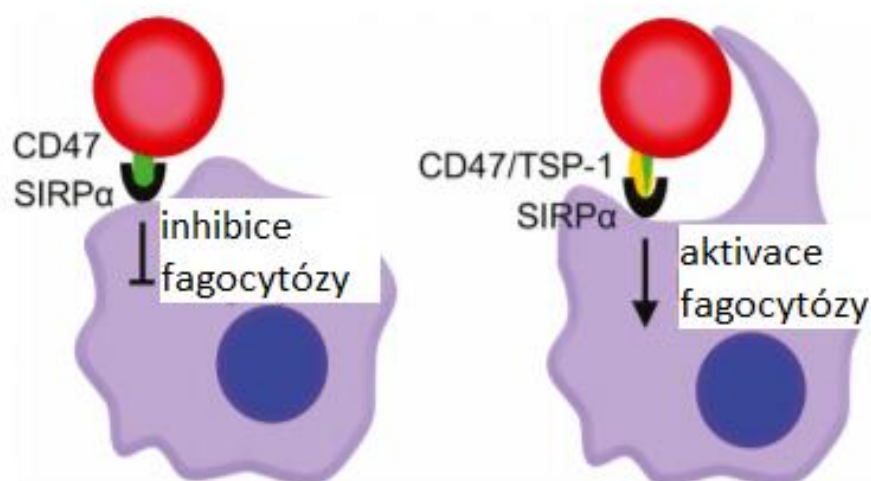
10 % starých erythrocytů se rozpadá přímo v krevním oběhu. Uvolněný hemoglobin se rozpadá na α - a β -dimery, které se váží na plazmatické bílkoviny, haptoglobiny. Tyto komplexy jsou vychytávány retikuloendotelovou soustavou (Penka, 2011). Pokud je nedostatek haptoglobinu v krevní plazmě, volný hemoglobin je filtrován v glomerulech ledvin a vzniká sraženina v lumen tubulu, což vede k selhání ledvin (Lang K., 2005). Dimery hemoglobinu také mohou být v krvi oxidovány na methemoglobin (Penka, 2011).

3.1.2 Signalizační látky pro erytrofagocytózu

Mezi signalizační látky podporující erytrofagocytózu patří proužek 3, fosfatidylserin a CD47. Proužek 3 je transmembránový protein erythrocytů, který se shlukuje a dochází k ukládání komplementových C3 fragmentů a přirozeně se vyskytujících IgG (Lang, 2010). Tento protein hraje významnou roli při odstraňování zestárlých a poškozených červených krvinek. Proužek 3 obsahuje 2 různé domény. První z nich je označována jako cytoplazmatická doména, jejíž úloha spočívá v regulaci struktury a funkce erythrocytů vazbou různých proteinů. Druhá doména je membránová, která katalyzuje výměnu iontů přes membránu erythrocytů (De Back, 2014) a na svém povrchu obsahuje antigenní determinanty. Díky těmto determinantům se IgG váží na proužek 3. Touto vazbou se vytvoří signál senescence a dojde k fagocytóze (Badior, 2018).

Fosfatidylserin je glycerolfosfolipid, který se u zdravých červených krvinek vyskytuje na vnitřní straně membrány a je regulován lipidovými transportéry. Tyto transportéry udržují fosfolipidovou strukturu membrány (Fischer, 2006). S přibývajícím věkem erytrocytů se zvyšuje obsah fosfatidylserinu na vnější straně membrány, což signalizuje makrofágům, aby danou buňku pozřely (De Back, 2014).

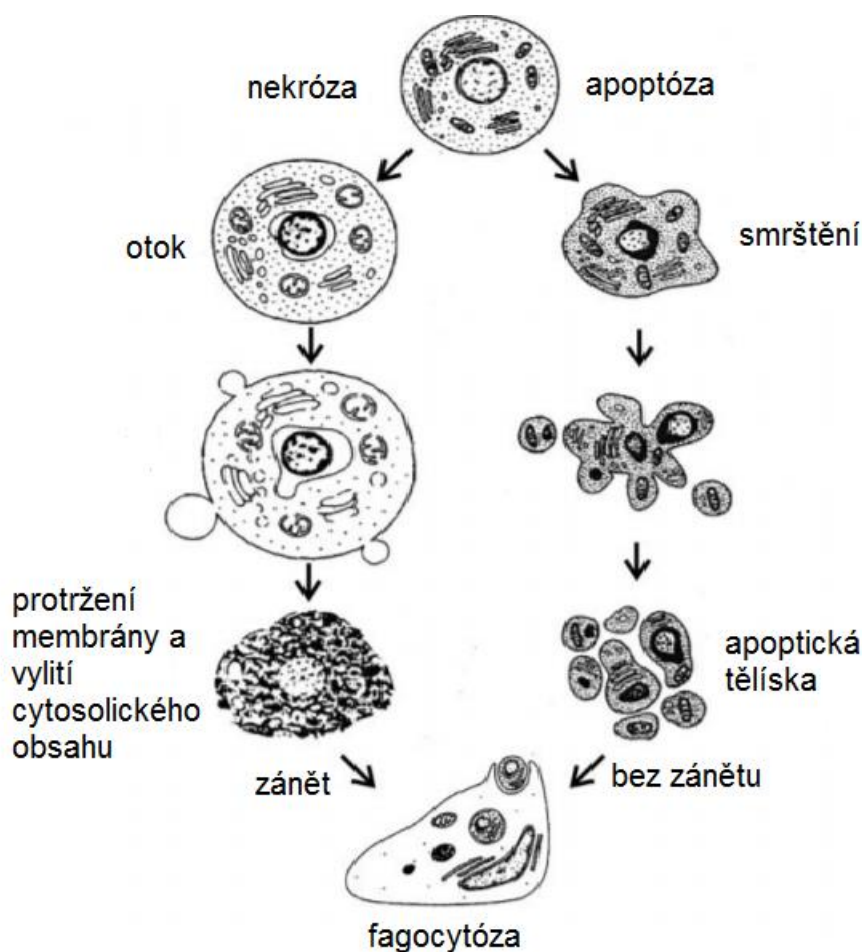
CD47 je transmembránový protein exprimovaný na povrchu všech zdravých buněk lidského těla. Tento protein se váže se signálním regulačním proteinem alfa (SIRP α). Takto vytvořený komplex poskytuje silný negativní signál, který inhibuje fagocytózu. Pokud se ale na protein CD47 naváže trombospondin 1 (TSP-1) včetně SIRP α , vzniklý komplex fagocytózu aktivuje (obr. 2) (De Back, 2014).



Obrázek 2: Inhibice a aktivace fagocytózy (CD47 – Cluster of Differentiation 47, SIRP α – signální regulační protein α , TSP-1 – trombospondin 1) (Van Bruggen, 2013).

3.2 Nekróza buněk

Mnoho vnějších a vnitřních stimulů způsobuje buněčnou smrt, která nejčastěji probíhá dvěma způsoby – apoptózou a nekrózou. Nekróza byla po dlouhou dobu vnímána jako alternativa programované buněčné smrti, apoptózy, ale později se u nich zjistily zcela odlišné vlastnosti (obr. 3). Na rozdíl od apoptózy není změna morfologie jádra spojena s organizovanou kondenzací chromatinu a tvorbou pravidelných fragmentů DNA.



Obrázek 3: Schéma nekrózy a apoptózy (Coleman, 2010).

Nekróza je patologická forma buněčné smrti postihující skupiny buněk na sebe navzájem naléhajících, při které dochází k nevratnému a nekontrolovanému poškození buněk po setkání se škodlivými stimuly (D'arcy, 2019). Typickým znakem nekrózy je otok (= edém), který vzniká z důvodu neschopnosti buněk udržet homeostázu se svým prostředím. Následkem otoku dochází k rozpadu plazmatické membrány a uvolnění cytoplazmatického obsahu do extracelulárního obsahu, což vyvolá zánětlivou reakci a poškození tkání (Escobar, 2015). Na stimulaci nekrózy se podílí především vápník, který způsobuje přetížení mitochondriálního vápníku, bioenergetické účinky a aktivaci proteáz, fosfolipáz a ROS. Tyto aktivované látky způsobí mitochondriální dysfunkci, iontovou nerovnováhu a ztrátu integrity membrány (Negroni, 2015). Takto poškozené buňky vydávají nebezpečné signály, které varují před buněčnou smrtí. Některé z těchto uvolněných signálů jsou rozpoznány buněčnými receptory a stimulují produkci prozánětlivých mediátorů. Jiné signály stimulují tvorbu mediátorů z extracelulárních zdrojů

a výsledné molekuly zprostředkovávají zánětlivou odpověď. Kromě toho mrtvé buňky uvolňují signály, které aktivují dendritické buňky a tím podporují tvorbu imunitní odpovědi na antigeny umírajících buněk (Rock, 2008).

Nekrotické procesy způsobují příčiny: mechanické (poranění), termické (spáleniny, omrzliny), elektrické (teplo), chemické (poleptání), hormonální, metabolické (zvýšená hladina draslíku), enzymatické, imunologické (aktivace komplementu), rentgenové a ionizační záření, mikroby, viry, plísně či hypoxie. Tyto stimuly působí na buňky nebo tkáně a způsobují jejich nekrózu, která vede ke vzniku různých onemocnění. Klasickým případem nekrotického stavu je ischemie (= nedokrevnost tkáně) (Proskuryakov, 2003).

Morfologicky se nekróza vyskytuje v několika formách. Koagulační nekróza je výsledkem denaturace bílkovin tkání. Tento druh nekrózy je pozorován v hypoxických prostředí parenchymatózních orgánů bohatých na bílkoviny (např. infarkty). Příčinou této nekrózy je ischemie. Další druh je nekróza kolikvační, která je charakterizována enzymatickým rozkladem tkání za vzniku kašovitě až kapalné hmoty. Tento druh nekrózy je typický pro cévní nervovou soustavu (např. encefalomalacie nebo myelomalacie), jelikož obsahuje velké množství trávicích enzymů a málo bílkovin. Mezi další druhy patří hemorrhagická, gangrenózní, kaseózní, tuková, fibrinoidní či Zenkerova vosková nekróza.

3.3 Programovaná buněčná smrt (apoptóza)

Apoptóza je forma geneticky regulované, programované a řízené buněčné smrti, během níž dochází k eliminaci nepotřebných, poškozených, nebezpečných, mutovaných či jinak pozměněných buněk za účelem udržování homeostázy organismu. Homeostáza je určena rovnováhou mezi rychlostí uvolňování nových erytrocytů z kostní dřeně do krevního oběhu a rychlostí odstraňování starých erytrocytů z oběhu pomocí retikuloendotelové soustavy (Vittori, 2012). Při apoptóze různé vnitřní a vnější stimuly spouští řadu vysoce řízených reakcí, které vedou ke smrti buněk (Grilo, 2019). Apoptózu indukuje, nebo inhibuje mnoho fyziologických a patofyziologických stimulů (tab. I a II), včetně aktivace různých transportních procesů na buněčné membráně. Mezi tyto transportní procesy patří aktivace aniontových, draselných a vápenatých kanálů, kanálů uvolňujících taurin a výměna Na^+/H^+ .

Avšak hlavním aktivátorem apoptózy je zvýšení intracelulárního vápníku uvnitř buněk po aktivaci vápenatých kanálů vlivem osmotického šoku, oxidačního stresu, nebo odstraněním intracelulárního a extracelulárního Cl^- (Lang, 2003). Každý den je u dospělého člověka apoptózou odstraněno 10 miliard buněk (Blanco, 2017).

Tabulka I: Inhibitory apoptózy buněk (Thompson, 1995).

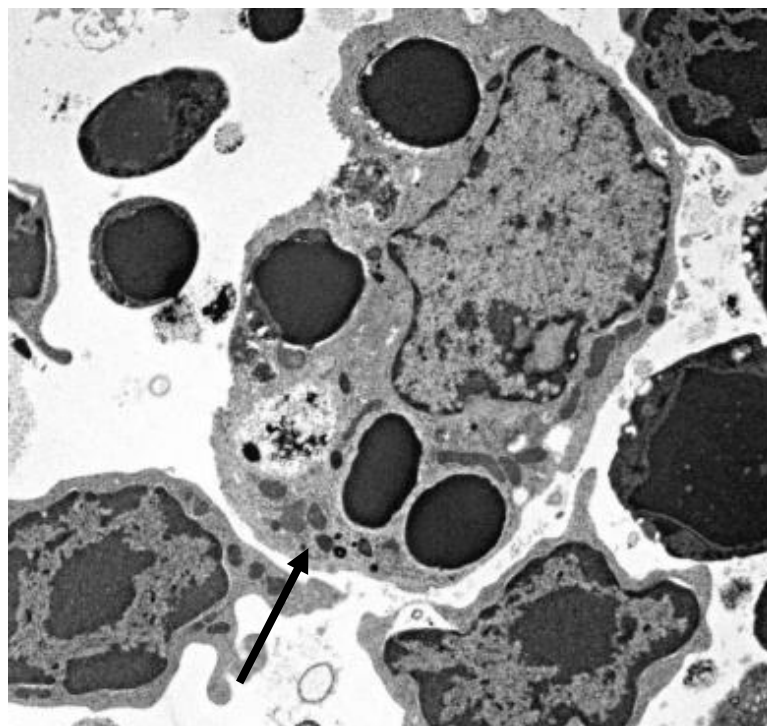
Fyziologické inhibitory	Virové geny	Farmakologická činidla
Růstové faktory	Adenovirus	Inhibitory kalpainu
Extracelulární matrix	Bakulovirus	Inhibitory cysteinové proteázy
CD40 ligand	Virus kravských neštovic	Tumorové promotory
Neutrální aminokyseliny	Virus Epstein-Barrové	Fenobarbital
Zinek	Virus afrického moru prasat	α -hexachlorocyklohexan
Estrogeny	Herpesvirus	
Androgeny		

Tabulka II: Induktory apoptózy buněk (TNF – tumor nekrotizující faktor) (Thompson, 1995).

Fyziologické induktory	Induktory související s poškozením	Terapie spojená s činidly	Toxiny
TNF, Fas ligand	Tepelný šok	Chemoterapeutika	Ethanol
Transformace růstového faktoru β	Virové infekce	Gama záření	Amyloid
Neurotransmitery (glutamát, dopamin, N-methyl-D-aspartát)	Bakteriální toxiny	UV záření	
Odstranění růstového faktoru	Onkogeny		
Ztráta připojení matrixu	Nádorové supresory		
Vápník	Cytolitické T-buňky		
Glukokortikoidy	Oxidanty		
CD95	Volné radikály		
Soli žlučových kyselin	Antimetabolity výživy		

V embryonálním vývoji člověka se pomocí apoptózy odstraňují některé buňky v nadbytku (např. mozkové buňky) (*Rehehan, 2001*). Jakmile je vývoj jedince dokončen, životaschopnost organismu závisí na udržování a obnovování dílčích částí organismu. V organismu se různé typy buněk liší mechanismy, pomocí kterých se udržují a obnovují po celý život. Například červené krevní buňky se neustále obnovují z hematopoetických progenitorových buněk. Lymfocyty a buňky v reprodukčních orgánech podstupují cyklické expanze, protože se účastní reprodukce. Naproti tomu neurony mají omezenou kapacitu pro samoobnovení, a proto většina těchto buněk přežívá v organismu po celý život (*Thompson, 1995*).

V buňkách během apoptózy probíhají biochemické změny. Na počátku apoptózy se buňky začnou smršťovat kvůli ztrátě intracelulární vody a také ztrácí kontakt se sousedními buňkami. U mitochondrií dochází k depolarizaci mitochondriální membrány a na cytoplazmatické membráně se tvoří záhyby. V jádře nastává kondenzace chromatinu, jeho degradace a následná fragmentace vlivem endonukleáz (*Föller, 2008*). V poslední fázi apoptózy se buňka rozdělí na apoptotická tělíska, která jsou obalená membránou (*Lawen, 2003*). Na vnějším povrchu těchto tělísek je vystavený fosfatidylserin, který je detekován vazbou annexinu a poskytuje signály vedoucí k pohlcení apoptotických tělísek makrofágy nebo sousedními buňkami (obr. 4) (*Malhi, 2010*). Mezi nejdůležitější makrofágy u apoptózy patří Kupfferovy buňky, ve kterých probíhá lysozomální degradace pohlcených tělísek bez uvolnění intracelulárních složek, především proteinů, které by jinak způsobily zánět (*Lang, 2003*).



Obrázek 4: Apoptóza v brzlíku s lymfocyty. Šipka označuje makrofág s pohlcenými apoptotickými tělísky (Elmore, 2007).

Apoptóza hraje významnou roli ve vývoji a progresi řady onemocnění. Některá onemocnění inhibují apoptózu. Jsou to např. rakovina (folikulární lymfomy, karcinomy s mutacemi p53, nádory související s hormony – rakovina prsu, rakovina prostaty, rakovina vaječníků), autoimunitní onemocnění (systémový lupus erythematoses, glomerulonefritida) a virové infekce (herpesviry, poxviry, adenoviry). Zvýšená apoptóza se vyskytuje u AIDS, neurodegenerativních onemocnění (Parkinsonova choroba, Alzheimerova choroba, amyotrofická laterální skleróza, *retinitis pigmentosa*, cerebelární degenerace), myelodysplastického syndromu jako je aplastická anémie, ischemického poškození orgánů (infarkt myokardu, mrtvice, reperfuční poškození), či onemocnění jater vyvolaného toxiny, jejichž příkladem je alkohol (Thompson, 1995).

Na apoptóze se podílí dvě nejdůležitější skupiny proteinů – kaspázy a B-buněčný lymfom 2 (*B-cell lymphoma 2*, Bcl-2). Tyto proteiny se účastní všech cest apoptotické buněčné smrti (Grilo, 2019).

3.3.1 Kaspázy

Kaspázy jsou endoproteázy s cysteinem v aktivním místě, které katalyzují štěpení peptidových vazeb v buněčných proteinech vždy za kyselinou

asparagovou, což vede k zániku těchto buněk. Téměř všechny kaspázy jsou syntetizovány jako monomery s malou, nebo žádnou aktivitou. Takto produkované formy jsou nazývány jako prokaspázy, nebo zymogeny (*Grilo, 2019*). Jejich aktivace probíhá proteolytickým štěpením za vzniku malých a velkých podjednotek. Toto štěpení zprostředkovávají jiné kaspázy, nebo kaspázy po spojení s adaptorovými proteiny. Například kaspázy 3 a 7 jsou aktivovány kaspázou 8 po spojení s adaptorovým proteinem FADD (Fas-asociovaná smrtící doména) a kaspázou 9 po spojení s adaptorem Apaf-1 (Apoptotická proteáza aktivující faktor 1). Tyto adaptorové proteiny se spojí s kaspázami pouze za předpokladu, že jsou samy signalizovány jinými proteiny. V případě FADD se jedná o protein CD95 a v případě Apaf-1 o cytochrom c (*Vaux, 2002*). Po aktivaci vznikají dimery, které jsou biologicky aktivní. V současné době existuje čtrnáct druhů kaspáz (1-14) vyskytující se v myších a lidských buňkách. Další čtyři druhy (15-18) byly objeveny v jiných savčích buňkách. Na základě jejich fylogenetické příbuznosti se dělí do tří skupin. První skupina (= iniciační kaspázy) zahrnuje kaspázy 2, 8, 9 a 10, které se aktivují v první fázi apoptózy. Tato skupina kaspáz aktivuje druhou skupinu (= efektorové kaspázy), která zahrnuje kaspázy 3, 6 a 7, a ty se podílí na poslední fázi apoptózy. Poslední skupina obsahuje kaspázy, které se přímo účastní zánětu (kaspázy 1, 4, 5, 11 a 12) (*Grilo, 2019*). Kaspáza 13 je hovězí gen a kaspáza 14 je exprimována v embryonálním vývoji (*Ray, 2019*).

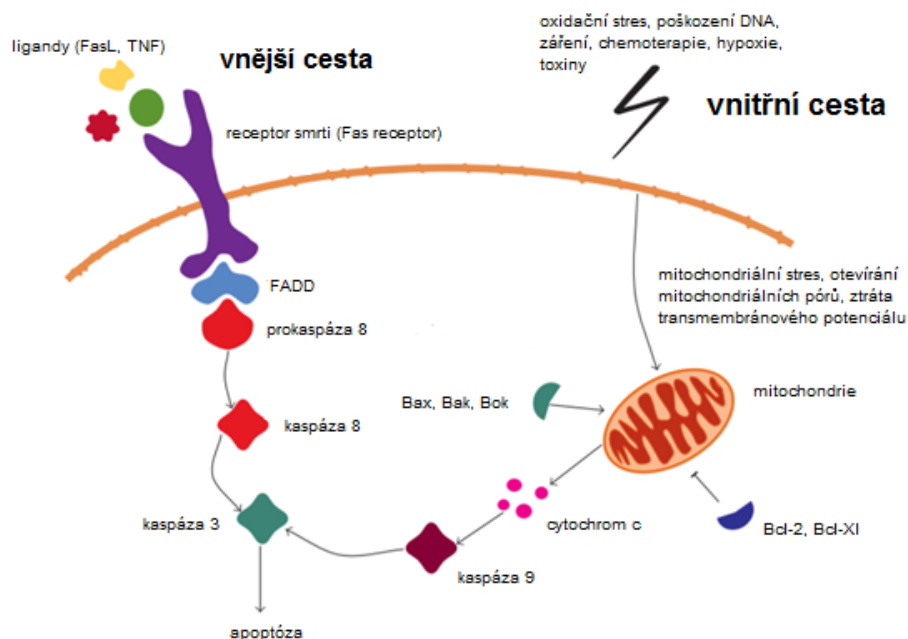
3.3.2 Bcl-2

Rodina proteinů Bcl-2 byla izolována z folikulárních B-lymfomů. Tyto proteiny jsou lokalizovány na vnější mitochondriální membráně, kde kontrolují uvolňování cytochromu c a proapoptotických proteinů do cytosolu a regulují aktivaci kaspáz (*Blanco, 2017*). Obsahují dvacet pět členů a alespoň jednu ze čtyř Bcl-2 homologních BH domén (BH1, BH2, BH3 a BH4). Tyto domény určují funkci a strukturu těchto proteinů. Některé proteiny obsahují i doménu transmembránovou, díky které se mohou vyskytovat na vnitrobuněčných membránách buněk (*Knight, 2019*). Lze je rozdělit na tři skupiny podle funkce – dvě skupiny proapoptotických a jedna skupina antiapoptotických proteinů. První skupina antiapoptotických proteinů zahrnuje Bcl-2 a jeho příbuzné formy, např. B-buněčný lymfom extra velký (Bcl-XL),

indukovaný protein myeloidní leukemické buňky (Mcl-1), aj. Tato skupina proteinů obsahuje všechny čtyři BH domény (BH1, BH2, BH3, BH4) a podporuje přežití buněk. Druhá skupina proapoptotických proteinů obsahuje tři BH domény (BH1, BH2, BH3) a zahrnuje proteiny Bcl-2 asociovaný X protein (Bax), Bcl-2 homologní antagonista/zabiják (Bak) a Bcl-2 příbuzný zabíjecí protein vaječnicků (Bok). Poslední, třetí skupina má pouze jednu doménu (BH3) a je složena z mnoha proteinů, např. Bcl-2 působící na smrt (Bik), p53-upregulovaný modulátor apoptózy (Puma), Bcl-2 modifikující faktor (Bmf), Bcl-2 asociovaný promotor buněčné smrt (Bad), aj. Tyto dvě skupiny proapoptotických proteinů podporují usmrcení buněk (Guicciardi, 2013).

3.3.3 Vnitřní a vnější cesta apoptózy

Apoptóza může probíhat vnitřní a vnější cestou dle typu působících stimulů (obr. 5).



Obrázek 5: Vnější a vnitřní cesta apoptózy (FasL – Fas ligand, TNF – tumor nekrotizující faktor, **FADD** – Fas-asociovaná smrtící doména, Bax – Bcl-2 asociovaný X protein, Bak – Bcl-2 homologní antagonista/zabiják, Bok – příbuzný zabíjecí protein vaječnicků, Bcl-2 – B-buněčný lymfom 2, Bcl-XI – B-buněčný lymfom extra velký) (Filén, 2010).

3.3.3.1 Vnitřní cesta apoptózy

Vnitřní (mitochondriální) cesta je regulována skupinou proteinů Bcl-2. Tato cesta se aktivuje při poškození mitochondrií řadou intracelulárních stimulů,

jakou jsou např. oxidační stres, poškození DNA, záření, léčba cytotoxickými léky, nedostatek hormonů nebo růstových faktorů, redoxní nerovnováha, toxiny, hypoxie nebo virová infekce (Lawen, 2003; Ray, 2019). Tyto stimuly narušují integritu mitochondrií tím, že dochází k otevírání mitochondriálních pórů a ztrátě transmembránového potenciálu (Elmore, 2007). To vyvolá uvolňování cytochromu c a proapoptotických proteinů (apoptózu-indukující faktor, AIF; endonukleáza G) z vnější mitochondriální membrány do cytosolu. V cytosolu se cytochrom c naváže na apoptotickou proteázu aktivující faktor 1 (Apaf-1), čímž se spustí utváření apoptozomu (Lawen, 2003). Vzniklý komplex následně aktivuje prokaspázu 9 na kaspázu 9. Tato iniciační kaspáza spustí hydrolytickou kaskádu, která stimuluje efektorové kaspázy 3, 6 a 7 (Blanco, 2017). AIF a endonukleáza G se uvolní do jádra, kde zprostředkovávají degradaci DNA a kondenzaci chromatinu nezávisle na kaspázové aktivitě (Guicciardi, 2013).

3.3.3.2 Vnější cesta apoptózy

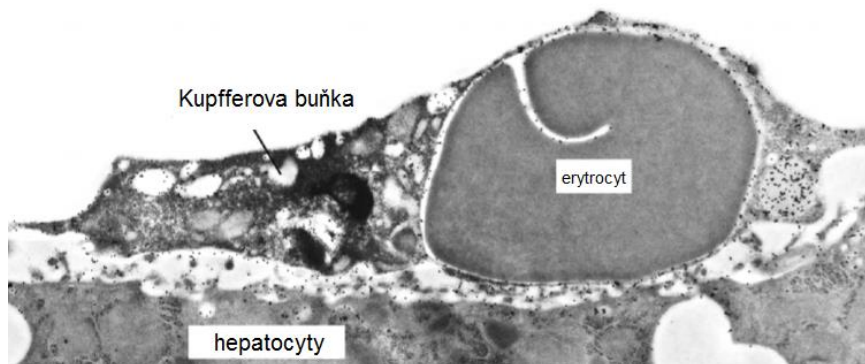
Vnější cesta je aktivována stimuly ve formě extracelulárních ligandů. Nejčastějšími ligandy jsou tumor nekrotizující faktor (TNF) a Fas ligand (FasL), které jsou rozpoznány receptory smrti (TNF receptor, Fas receptor) umístěnými na cytoplazmatické membráně. Daný receptor obsahuje membránovou doménu a doménu smrti. Dochází k navázání ligandu na receptor. Po vazbě se mění konformace smrtící domény a může dojít k navázání adaptorového proteinu. Adaptorový protein zahrnuje TNFR-asociovanou smrtící doménu (TRADD) a Fas-asociovanou smrtící doménu (FADD) (Blanco, 2017). Navázání ligandu Fas na Fas receptor vede k vazbě adaptorového proteinu FADD. Vazba ligandu TNF na TNF receptor má za následek vazbu adaptorového proteinu TRADD i FADD (Hsu, 1995). FADD obsahuje smrtící efektorovou doménu, která interaguje s iniciátorem prokaspázy 8 a vzniká signální komplex vyvolávající smrt (DISC). Prokaspáza 8 je aktivována a iniciuje kaspázovou kaskádu. Aktivovaná kaspáza 8 aktivuje kaspázu 3 a další kaspázy (Blanco, 2017). Takto aktivované kaspázy následně štěpí proteiny a dochází k apoptóze.

3.4 Eryptóza

Životnost zdravých erytrocytů je omezena stárnutím s následným odstraněním starých erytrocytů (Lang, 2015b). Během přirozeného stárnutí nebo následkem poranění mohou erytrocyty podstupovat programovanou

buněčnou smrt, zvanou eryptóza, která trvá 1-48 hodin (*Ghashghaieinia, 2012; Qadri, 2017*).

Eryptóza je proces, při kterém dochází ke změně asymetrie na buněčné plazmatické membráně erytrocytů. Transmembránová asymetrie je podporována ATP-dependentními transportéry a hraje důležitou roli při fungování membránových proteinů a lipidů, nebo při interakci s cytoskeletem (*Pyrshv, 2018*). Změna asymetrie je způsobena vezikulací membrány, smrštěním buněk (redukci objemu), tvorbou nepravidelných záhybů na plazmatické membráně (rozvolnění cytoskeletu, degradace proteinů, ztráta fosfolipidů), snížením membránové elasticity a transportem fosfatidylserinu z vnitřní strany membrány na vnější. Takto poškozené erytrocyty jsou rozpoznávány makrofágy, následně pohlceny, degradovány (obr. 6) a tím vyloučeny z krevního oběhu (*Repsold, 2018*). Na rozdíl od apoptózy nedochází k mitochondriální depolarizaci a ke kondenzaci jádra z důvodu absence těchto organel v erytrocytech. Z toho plyne, že eryptóza a apoptóza mají stejný účel, tj. odstranění defektních, infikovaných, nebo jinak defektních buněk bez prasknutí buněčné membrány a uvolnění intracelulárního materiálu do cirkulující krve.



Obrázek 6: Fagocytóza erytrocytu Kupfferovou buňkou v játrech (*Lang K., 2005*).

Celý mechanismus eryptózy je regulován řadou kináz, jako jsou cyklický guanosinmonofosfát(cGMP)-dependentní proteinkináza typu I a Janusova kináza 3 (*Lang, 2012a*). Na regulaci se kromě kináz také podílí endogenní mediátory, iontové kanály, membránové receptory a nitrobuněčné signální proteiny (*Qadri, 2017*).

3.4.1 Mechanismus eryptózy

Eryptóza je primárně způsobena zvýšenou koncentrací cytosolového Ca^{2+} , jako následek aktivace vápenatých kanálů, které zprostředkovávají přísun extracelulárního vápníku do erytrocytů (Lang, 2012c). K aktivaci těchto kanálů dochází při hyperosmotickém šoku, tvorbě ceramidu, depleci energie, oxidačním stresu, zvýšené teplotě, snížené antioxidační obraně, nedostatku chloru, aktivaci kaspáz nebo vlivem endogenních látek a užíváním xenobiotik. (Föller, 2009). Tyto kanály jsou propustné i pro jiné ionty (např. Na^+) a jsou stimulovány prostaglandinem E2 (PGE2), který je produkován z membránových fosfolipidů působením fosfolipázy A2, cyklooxygenázy a PGE-syntázy (Pretorius, 2016). Kromě toho, aktivita vápenatých kanálů ovlivňuje i kanály draselné, tj. tzv. Gordošovy kanály, citlivé na Ca^{2+} . Po aktivaci těchto kanálů dojde k odtékání intracelulárního K^+ z erytrocytů do extracelulárního prostoru, což vede ke ztrátě vody a smrštění erytrocytů (Schneider, 2006). Kromě toho, vytékání draselných iontů a vtékání sodíkových iontů přes kanály rozptýlí příslušné iontové gradienty napříč buněčnou membránou. Rozptýlení gradientu nakonec vede k depolarizaci buněčné membrány a tím ke vtékání chloridových iontů a vody do buněk. To má za následek vznik otoků. Nadměrné nabobtnání buněk vede k prasknutí buněčné membrány a uvolnění hemoglobinu (Föller, 2010). Činnost těchto kanálů klesá s věkem erytrocytů (Lang, 2008).

Se ztrátou chloridových iontů dochází k uvolňování prostaglandinu E2, který následně aktivuje kationtové kanály, zvyšuje koncentraci vápníku v buňce a stimuluje přesun fosfatidylserinu z vnitřní strany buněčné membrány na povrch erytrocytů pomocí skramblázy (Lang K., 2005). Jakmile dojde k vystavení fosfatidylserinu na povrchu buněčné membrány, jsou ihned rozpoznány makrofágy se specifickými fosfatidylserinovými receptory a pohlceny, aby se zajistilo jejich odstranění z krevního oběhu (Repsold, 2018). Následkem zvýšené koncentrace vápenatých iontů se také aktivují citlivé enzymy, např. transglutamináza, kalpain, proteinkináza a fosfatáza (Qadri, 2017). Kalpain je cysteinová endopeptidáza způsobující degradaci cytoskeletálních proteinů erytrocytů, což vede k tvorbě nepravidelných záhybů na plazmatické membráně (Lang, 2008).

Nezávisle na zvýšené koncentraci cytosolového vápníku může být eryptóza spuštěna narušením cytoskeletální interakce s buněčnou membránou,

což je vyvoláno rozpadem sfingomyelinu. Z takto rozpadlého sfingomyelinu vzniká ceramid pomocí kyselé sfingomyelinázy (Qadri, 2018), která štěpí fosfodiesterové vazby. Vyskytuje se uvnitř erytrocytů nebo v plazmě a její aktivita závisí na pH a složení membrány (Lang, 2015a). Sfingomyelináza je stimulována faktorem aktivujícím destičky (PAF). PAF hraje důležitou roli při regulaci zánětu, trombóze, vzniku aterosklerózy, kardiovaskulárních funkcí (Lang P. A., 2005) a je generován z membránových fosfolipidů fosfolipázou A2, která je aktivována při smrštění erytrocytů (Lang, 2012b). Vzniklý ceramid patří do skupiny sfingolipidů vznikajících navázáním mastné kyseliny na aminoskupinu sfingosinu pomocí amidové vazby. V erytrocytech je lokalizován ve shlucích, kde aktivuje skramblázy, čímž narušuje interakci membrány s cytoskeletem a zvyšuje křehkost membrány. Tyto změny vedou k vezikulaci, rigiditě a zvýšené membránové permeabilitě. Tvorba ceramidu je inhibována amitriptylinem a vysokými koncentracemi močoviny (Lang, 2015a).

Aby nedocházelo k velkému počtu naprogramovaných buněčných smrtí, jsou erytrocyty vybaveny antioxidačními obrannými mechanismy, což jsou: vitamín C, vitamín E, glutathion a enzymy (superoxiddismutáza, kataláza, peroxiredoxin 2 a glutathionperoxidáza). Tyto látky zhasí ROS v erytrocytech a přeměňují je na peroxid vodíku, který je následně pomocí katalázy rozložen na kyslík a vodu. Např. u myši s deficitem g-glutamylcysteinligázy, enzymu nezbytného pro tvorbu glutathionu, se zvýšila citlivost erytrocytů na náchylnost k eryptóze a hemolýze (Lang, 2014).

Eryptóza je stimulována a inhibována řadou látek (tab. III a IV). Mezi nejvýznamnější inhibitory se řadí oxid dusnatý aktivovaný G-kinázou, katecholaminy, vysoká koncentrace močoviny a erythropoetinu, které činí erytrocyty částečně rezistentní vůči eryptóze. Po vazbě erythropoetinu na erytrocyty se inaktivují vápenaté kanály a jeho akutní intravenózní podání snižuje počet cirkulujících erytrocytů podléhajících eryptóze u pacientů podstupujících léčbu hemodialýzou (Myssina, 2003). Na inhibici se podílí i endotelin-1, který pomocí receptoru typu B (ETB) zabraňuje zvyšování koncentrace vápníku (Föller, 2010).

Tabulka III: Stimulátory eryptózy (Lang, 2012a).

Léky	Prvky	Proteiny a lipidy	Toxiny	Vnější vlivy	Kyseliny
Amantadin	Arsen	Amyloid	Enniatin A	Látky znečišťující prostředí	Kyselina fytová
Amfotericin B	Cín	Ceramid	Hemolyzin	Osmotický šok	Kyselina lipoová
Amiodaron	Hliník	Cyklosporin	Listeriolyzin	Oxidační stres	Kyselina retinová
Azathioprin	Kadmium	Glykoforin C			
Beauvericin	Lithium	Lipopeptidy			
Chlorpromazin	Měď	Sfingosin			
Ciglitazon	Olovo	Trombospondin 1 receptor CD47			
Cisplatina	Rtuť				
Dimethyl fumarát	Selen				
Fingolimod	Stříbrné ionty				
Methyldopa	Zinek				
Monensin	Zlato				
Oridonin					
Paclitaxel					
Valinomycin					

Tabulka IV: Inhibitory eryptózy (Lang, 2012a).

Léky	Hormony	Alkaloidy	Enzymy	Antioxidanty	Toxiny
Amilorid	Adrenalin	Kofein	G kináza	Resveratrol	Sarafotoxin 6C
Amitriptylin	Dopamin	Staurosporin	Janusova kináza 3		
Isoprenalin	Erythropoetin				
Kyselina flufenamová	Katecholaminy				
Kyselina niflumová					
Zidovudin					

3.4.2 Fyziologický význam eryptózy

Fyziologicky je eryptóza považována za preventivní opatření, jelikož omezuje vznik předčasné hemolýzy, a tím zvýšené hemoglobinové hladiny v krvi. Zvýšený hemoglobin se může po filtraci v ledvinách srážet a způsobit tak okluzi (uzávěr) renálních tubulů. Navíc může sloužit jako obranný mechanismus proti hemolýze vyvolané malárií. Mezi další pozitivní účinek eryptózy patří odstranění nadbytečných erytrocytů z krevního oběhu. Zvýšená hladina erytrocytů má za následek vysoké riziko kardiovaskulárních trombotických příhod (Qadri, 2017).

3.4.3 Patologický význam eryptózy

Při nadměrné eryptóze červené krvinky ulpívají na krevních destičkách a endotelových buňkách cévní stěny a tím brání mikrocirkulaci. Vazbou na krevní destičky mohou erytrocyty stimulovat srážení krve a spouštět trombózu (Lang, 2015a). Nejčastější patologický stav je hemolytická anémie. Dochází k ní při narušení homeostázy, kdy zrychlená ztráta erytrocytů není dostatečně kompenzována zvýšenou tvorbou nových erytrocytů (Lang, 2010). Hemolytická anémie může vzniknout při ztrátě krve, snížené životnosti erytrocytů, získané nebo vrozené vadě, neefektivní erythropoéze, nebo poškození tvorby červených krvinek (Vittori, 2012).

Nadměrná eryptóza se vyskytuje při řadě poruch, kterými jsou např. nedostatek železa, deplece fosfátů, dehydratace, hyperbilirubinémie, sepse, hypertermie, *diabetes mellitus*, Parkinsonova choroba, renální insuficience, jaterní a srdeční selhání, chronická choroba ledvin, malárie, malignity, srpkovitá anémie, β -talasémie, deficit glukózy-6-fosfátdehydrogenázy (G6PD), Wilsonova choroba, mutace, nedostatek aniontových měničů (mutace aniontového výměníku AE1 a glukózového transportéru GLUT1) (Lang, 2015b), infekce mykoplazmaty, hereditární sférocytóza, hemolytický uremický syndrom, paroxysmální noční hemoglobinurie nebo myelodysplastický syndrom (Lang, 2012a). U zdravých jedinců dochází ke vzniku anémie v důsledku hemolýzy mladých cirkulujících červených krvinek a úbytku erythropoetinu po návratu z míst, kde byla vysoká nadmořská výška, nebo z letu do kosmu. Tento jev je nazýván neocytolýza (Rice, 2005).

3.4.3.1 Diabetes mellitus

V krvi diabetických pacientů se nachází zvýšený počet erytrocytů, které na svém povrchu vystavují fosfatidylserin. U tohoto onemocnění je eryptóza částečně stimulována akumulací toxického methylglyoxalu, produktu glykolýzy, jehož tvorba je zvýšená při hyperglykémii. Methylglyoxal inhibuje glykolýzu, čímž se snižuje tvorba ATP a koncentrace glutathionu v erytrocytech (*Calderón, 2011*). Navíc hyperglykémie spouští oxidační stres a následkem toho dochází k depleci glutathionu, akumulaci malondialdehydu, zvýšení aktivity superoxididismutázy (*Lang, 2015a*) a akumulaci ROS, které jsou považovány za diagnostické markery. Diabetes typu II je spojen s peroxidací lipidů, která vede k poškození erytrocytů (*Lang, 2014*).

3.4.3.2 Chronické onemocnění ledvin

Chronické onemocnění ledvin je spojeno s těžkou anémií, která vzniká z nedostatku železa. Dochází ke sníženému uvolňování erythropoetinu z ledvin a poklesu erythropoézy. Nedávné studie ukázaly, že se anémie u pacientů s tímto onemocněním vyskytuje i po doplnění erythropoetinu do krevního oběhu. Oxidační stres, hyperfosfatemie a vznikající uremické toxiny (vanadát, akrolein, indoxylsulfát, methylglyoxal) podporují eryptózu. U pacientů s terminálním stádiem renálního onemocnění dochází k akumulaci ROS, které jsou redukovány během dialýzy (*Lang, 2015a*).

3.4.3.3 Hemolytický uremický syndrom

Hemolytický uremický syndrom vznikající v důsledku intoxikace bakteriemi (např. *Escherichia coli*) je doprovázen triádou příznaků: hemolytickou anémií s fragmentovanými erytrocyty, trombocytopenií a akutním selháním ledvin. Toto onemocnění může být také způsobeno nedostatkem faktoru H inaktivujícím komplement, který řídí aktivaci komplementu C3 a depozici C3b na hostitelské buňky. Jeho nedostatek vyvolává oxidační stres, vystavení fosfatidylserinu na povrchu erytrocytů, jejich smrštění, zvýšenou koncentraci cytosolového Ca²⁺ a tvorbu ceramidu. Akutní fáze HUS je spojena s trombotickou mikroangiopatií, peroxidací lipidů a tvorbou ROS, které jsou generovány z neutrofilů. K léčbě tohoto syndromu se používá plazmaferéza nebo dialýza (*Lang, 2006*).

3.4.3.4 Wilsonova choroba

Wilsonova choroba je autosomálně recesivní porucha vyplývající z akumulace Cu^{2+} především v hepatocytech, neuronech, erytrocytech a myocytech v důsledku defektu enzymu ceruloplazminu, který měď transportuje. Přebytek mědi vyvolává anémii, jaterní cirhózu, hepatitidu, jaterní selhání, Fanconiho syndrom, neurologické a psychiatrické příznaky, kardiomyopatii a osteomalácií. Kromě toho, akumulovaná měď tvoří ROS, lipidové peroxidy a inhibuje aktivitu antioxidantních enzymů, což má za následek poškození buněk, denaturaci hemoglobinu a vznik Heinzových tělísek. Na stimulaci eryptózy se také podílí aktivace sfingomyelinázy a následné uvolňování ceramidu v erytrocytech a hepatocytech (Lang, 2007).

3.4.3.5 Nedostatek železa a malignity

Nedostatek železa zvyšuje počet erytrocytů, u kterých dochází ke ztrátě objemu, zvyšování cytosolového Ca^{2+} a vystavení fosfatidylserinu na jejich povrchu. Při zrychlené sebevražedné smrti takto poškozených erytrocytů dochází ke zvýšenému odstraňování železa, což vede ke vzniku anémie, oxidačního stresu a ROS (Lang, 2014). U malignit je eryptóza spuštěna účinkem cytostatické léčby. Cytostatická léčiva spouští současně s eryptózou i apoptózu jaderných buněk (Lang, 2015a).

3.4.3.6 Srpkovitá anémie, β -talasémie, deficit G6PD

U těchto poruch je eryptóza podporována především oxidačním stresem, osmotickým šokem a deplecí energie. Normální poločas životnosti erytrocytů 60 dní je zkrácen na přibližně 6 dní u srpkovité anémie, 15 dní u talasémie a 22 dní při deficitu G6PD (Lang, 2002). Erytrocyty vystavující fosfatidylserin adherují na endotelové buňky cévní stěny a narušují mikrocirkulaci. U srpkovité anémie mění erytrocyty svůj tvar a vážou se na plicní cévní stěnu. Tato vazba je stimulována aktivovanými neutrofily a inhibována anexinem V. Bylo prokázáno, že u dětí fetální hemoglobin působí proti depolymerizaci deoxygenovaného hemoglobinu srpkovitých erytrocytů, vystavení fosfatidylserinu a adhezi na endotelové buňky. Dospělý člověk, který je nositelem jednoho zdravého genu HbA a jednoho genu mutovaného HbS, je nazýván zdravým přenašečem a jeho erytrocyty reagují na infekci způsobenou parazitem *Plasmodium falciparum* zvýšenou tvorbou (PGE₂), permeabilitou Ca^{2+} , expozicí

fosfatidylserinu a odstraňováním makrofágy. Takto infikované erythrocyty rychleji podléhají programované smrti, což poskytuje určitou ochranu před vypuknutím těžkého stádia malárie. K léčbě srpkovité anémie se využívá hydroxymočovina, která brání vzniku srpkovitých erythrocytů, a tedy vazookluzním, neboli oběhovým krizím (Lang, 2014).

3.4.3.7 Malárie

Původcem malárie je patogen *Plasmodium falciparum*, který aktivuje a otevírá vápenaté kanály erythrocytů, a tím vyvolává oxidační stres buněk vedoucí k eryptóze. Poté se tento patogen dostává dovnitř erythrocytů, kde se množí, přijímá živiny (Na^+ , Ca^{2+}) a spotřebovává metabolity. Patogen je schopen inhibovat vstup Ca^{2+} do erythrocytů a tím udržuje nízkou hladinu cytosolového Ca^{2+} . Mimo to snižuje osmotický tlak štěpením přebytečné hemoglobinu a exportem aminokyselin, čímž zabraňuje předčasné hemolýze. Infekce nakonec vede k vystavení fosfatidylserinu a tím k fagocytotickému odstranění infikovaných erythrocytů obsahujících patogeny. Na druhou stranu patogeny umí měnit své povrchové proteiny a snadno dokážou uniknout imunitní reakci (Lang, 2014).

3.4.3.8 Paroxysmální hemoglobinurie, myelodysplastický syndrom

Paroxysmální noční hemoglobinurie je klonální porucha hematopoetických kmenových buněk, která zvyšuje náchylnost k intravaskulární hemolýze, trombóze a dřeňovým selháním. Tato diagnóza zahrnuje deficit exprese membránových proteinů CD55 a CD59. Naproti tomu je myelodysplastický syndrom definován jako klonální porucha kostní dřeně charakterizovaná refrakterní cytopenií jako následek neúčinné hematopoézy s poškozenými erytroidními prekurzory vedoucí k anémii. V pozdní fázi tohoto syndromu dochází ve 30 % případů ke vzniku akutní myeloidní leukémie. Někdy je klon paroxysmální noční hemoglobinurie pozorován i u pacientů s myelodysplastickým syndromem, což svědčí o tom, že tyto dvě onemocnění se navzájem překrývají. Výsledkem obou onemocnění je produkce ROS, které snižují životnost erythrocytů a vzniká chronická anémie (Basu, 2013).

3.4.3.9 Mutace GLUT1

Syndrom nedostatku GLUT1 je forma epileptické encefalopatie, která je způsobená poruchou transportu glukózy přes hematoencefalickou bariéru do mozku v důsledku mutace genu SLC2A1 (*Aulická, 2018*). Jedinci trpí paroxysmální kinezigenní dyskinezi, což je porucha projevující se krátkými záchvaty mimovolných pohybů vyvolaná epilepsií. Dále se u nich objevuje mírné vývojové zpoždění, snížení hladiny glukózy v mozkomíšním moku a hemolytická anémie s echinocytózou (*Lang, 2008*). K léčbě se volí ketogenní dieta, která je založena na přijímání tuků a nízkého množství proteinů a sacharidů. Mezi podpůrnou léčbu řadíme pravidelné užívání kyseliny α -lipoové jako antioxidantu, triheptanoinu, tj. triglyceridu tvořícího ketolátky, a diuretika acetazolamidu (*Aulická, 2018*).

3.4.3.10 Deplece fosfátů

Deplece fosfátů (= hypofosfatémie) je porucha způsobená nedostatečným příjmem fosfátů v dietě, sníženou intestinální absorpcí, odstraněním ledvin nebo buněčnou redistribucí fosfátů. Mezi primární příčiny se řadí hladovění, průjemy, antacida vázající se na fosforečnan, hyperparatyreóza, deficit vitamínu D, renální tubulární nebo intestinální transportní defekty, diuretická léčba, expanze extracelulárního objemu, nadbytek glukokortikoidů a mineralokortikoidů, užívání lékořice, hyperventilace, leukémie, sepse, jaterní kóma, abstinence alkoholu a podávání glukózy nebo inzulínu. Následkem nedostatku fosfátů dochází ke vzniku anémie. Také se snižuje tvorba ATP, což vede ke zvýšení cytosolového Ca^{2+} uvnitř erytrocytů a spuštění eryptózy (*Birka, 2004*).

4. ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo podat základní poznatky o erytrocytech a seznámit se s mechanismy jejich zániku. V této oblasti jsem se během zpracování dozvěděla mnoho zajímavých a nových informací z literárních pramenů. Věřím, že tyto poznatky využiji při mém budoucím povolání.

Každý den v mnoha zemích světa probíhají výzkumy v této oblasti, jelikož poznatky ze stavby a funkce erytrocytů nejsou zcela úplné. A tak vědcům zbývá ještě mnoho práce, než funkce červené krvinky bude plně pochopena.

5. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. ALBERTS, B., D. BRAY, A. JOHNSON, J. LEWIS, M. RAFF, et al.: Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky, Espero, **2005**, 2. vydání, s. 630. ISBN 80-902-9062-0.
2. AULICKÁ, Š., K. ČESKÁ a H. OŠLEJŠKOVÁ: Glucose transporter-1 deficiency syndrome – expanding the clinical spectrum of a treatable disorder, **2018**, 81/114(2), s. 171-173. DOI: 10.14735/amcsnn2018171.
3. BADIOR, K. E. a J. R. CASEY: Molecular mechanism for the red blood cell senescence clock, **2018**, 70(1), s. 32-40. DOI: 10.1002/iub.1703.
4. BASU, S., D. BANERJEE, M. GHOSH a A. CHAKRABARTI: Erythrocyte membrane defects and asymmetry in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and myelodysplastic syndrome, **2013**, 15(4), s. 236-239. DOI: 10.1179/102453309X12583347114095.
5. BIRKA, C., P. A. LANG, D. S. KEMPE, L. HOEFLING, V. TANNEUR, et al.: Enhanced susceptibility to erythrocyte „apoptosis“ following phosphate depletion, 2004, 448(5), s. 471-477. DOI: 10.1007/s00424-004-1289-y.
6. BLANCO, A. a G. BLANCO: Apoptosis. Medical Biochemistry, Elsevier, **2017**, s. 791-796, ISBN 9780128035504.
7. BOSMAN, G. J., F. L. WILLEKENS a J. M. WERRE: Erythrocyte aging: a more than superficial resemblance to apoptosis, **2005**, 16(1-3), s. 1-8. DOI: 10.1159/000087725.
8. CALDERÓN-SALINAS, J. V., E. G. MUÑOZ-REYES, J. F. GUERRERO-ROMERO, M. RODRÍGUEZ-MORÁN, R. L. BRACHO-RIQUELME, et al.: Eryptosis and oxidative damage in type 2 diabetic mellitus patients with chronic kidney disease, **2011**, 357(1-2), s. 171-179. DOI: 10.1007/s11010-011-0887-1.
9. COLEMAN, W. B. a G. J. TSONGALIS: Essential concepts in molecular pathology, Elsevier, **2010**. ISBN 978-0-12-374418-0.
10. D'ARCY, M. S.: Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy, **2019**, 43(6), s. 582-592.

11. DE BACK, D. Z., E. B. KOSTOVA, M. VAN KRAAIJ, T. K. VAN DEN BERG a R. VAN BRUGGEN: Of macrophages and red blood cells; a complex love story, **2014**, 5, s. 1-11. DOI: 10.3389/fphys.2014.00009.
12. ELMORE, S.: Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death, **2007**, 35(4), s. 495-516. DOI: 10.1080/01926230701320337.
13. ESCOBAR, M. L., O. M. ECHEVERRÍA a G. H. VÁZQUEZ-NIN: Necrosis as Programmed Cell Death, **2015**, s. 420-434. ISBN 978-953-51-2236-4.
14. FILÉN, S. a R. LAHESMAA: GIMAP Proteins in T-Lymphocytes, **2010**, s. 1-10. DOI: 10.1155/2010/268589.
15. FISCHER, K., S. VOELKL, J. BERGER, R. ANDREESSEN, T. POMORSKI, et al.: Antigen recognition induces phosphatidylserine exposure on the cell surface of human CD8+ T cells, **2006**, 108(13), s. 4094-4101. DOI: 10.1182/blood-2006-03-011742.
16. FÖLLER, M., D. BOBBALA, S. KOKA, S. M. HUBER, E. GULBINS, et al.: Suicide for Survival - Death of Infected Erythrocytes as a Host Mechanism to Survive Malaria, **2009**, 24(3-4), s.133-140. DOI: 10.1159/000233238.
17. FÖLLER, M., H. MAHMUD, S. M. QADRI, S. GU, M. BRAUN, et al.: Endothelin B receptor stimulation inhibits suicidal erythrocyte death, **2010**, 24(9), s. 3351-3359. DOI: 10.1096/fj.10-159483.
18. FÖLLER, M., S. M. HUBER a F. LANG: Erythrocyte programmed cell death, **2008**, 60(10), s. 661-668. DOI: 10.1002/iub.106.
19. GHASHGHAEINIA, M., J. C. CLUITMANS, A. AKEL, P. DREISCHER, M. TOULANY, et al.: The impact of erythrocyte age on eryptosis, **2012**, 157(5), s. 606-614. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2012.09100.x.
20. GOTTLIEB, Y., O. TOPAZ, L. A. COHEN, L. D. YAKOV, T. HABER, et al.: Physiologically aged red blood cells undergo erythrophagocytosis in vivo but not in vitro, **2012**, 97(7), s. 994-1002. DOI: 10.3324/haematol.2011.057620.
21. GRILO, A. L. a A. MANTALARIS: Apoptosis: A mammalian cell bioprocessing perspective, **2019**, 37(3), s. 459-475. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2019.02.012.

22. GUICCIARDI, M. E., H. MALHI, J. L. MOTT a G. J. GORES: Apoptosis and Necrosis in the Liver, John Wiley & Sons, **2013**, 3(2), s. 1-62. ISBN 9780470650714.
23. HSU, H., J. XIONG a D. V. GOEDEL: The TNF receptor 1- associated protein TRADD signals cell death and NF- κ B activation, **1995**, 81(4), s. 495-504. DOI: 10.1016/0092-8674(95)90070-5.
24. CHOW, A., B. D. BROWN a M. MERAD: Studying the mononuclear phagocyte system in the molecular age, **2011**, 11(11), s. 788-798. DOI: 10.1038/nri3087.
25. KNIGHT, T., D. LUEDTKE, H. EDWARDS, J. W. TAUB a Y. GE: A delicate balance – The BCL-2 family and its role in apoptosis, oncogenesis, and cancer therapeutics, **2019**, 162, s. 250-261. DOI: 10.1016/j.bcp.2019.01.015.
26. LANG, E., S. M. QADRI a F. LANG: Killing me softly - Suicidal erythrocyte death, **2012b**, 44(8), s. 1 236-1 243. DOI: 10.1016/j.biocel.2012.04.019.
27. LANG, E. a F. LANG: Mechanisms and pathophysiological significance of eryptosis, the suicidal erythrocyte death, **2015a**, 39, s. 35-42. DOI: 10.1016/j.semcd.2015.01.009.
28. LANG, E., R. BISSINGER, E. GULBINS a F. LANG: Ceramide in the regulation of eryptosis, the suicidal erythrocyte death, **2015b**, 20(5), s. 758-767. DOI: 10.1007/s10495-015-1094-4.
29. LANG, F. a S. M. QADRI: Mechanisms and Significance of Eryptosis, the Suicidal Death of Erythrocytes, **2012a**, 33(1-3), s. 125-130. DOI: 10.1159/000334163.
30. LANG, F., E. GULBINS, H. LERCHE, S. M. HUBER, D. S. KEMPE, et al.: Eryptosis, a Window to Systemic Disease, **2008**, 22(5-6), s. 373-380. DOI: 10.1159/000185448.
31. LANG, F., E. GULBINS, P. A. LANG, D. ZAPPULLA a M. FÖLLER: Ceramide in suicidal death of erythrocytes, **2010**, 26(1), s. 8-21. DOI: 10.1159/000315102.
32. LANG, F., E. LANG a M. FÖLLER: Physiology and Pathophysiology of Eryptosis, **2012c**, 39(5), s. 308-314. DOI: 10.1159/000342534.

33. LANG, F., K. S. LANG, P. A. LANG, S. M. HUBER a T. WIEDER: Mechanisms and Significance of Eryptosis, **2006**, 8(7-8), s. 1183-1192. DOI: 10.1089/ars.2006.8.1183.
34. LANG, F., K. S. LANG, T. WIEDER, S. MYSSINA, C. BIRKA, et al.: Cation channels, cell volume and the death of an erythrocyte, **2003**, 447(2), s. 121-125. DOI: 10.1007/s00424-003-1150-8.
35. LANG, F., M. ABED, E. LANG a M. FÖLLER: Oxidative Stress and Suicidal Erythrocyte Death, **2014**, 21(1), s. 138-153. DOI: 10.1089/ars.2013.5747.
36. LANG, K. S., B. ROLL, S. MYSSINA, M. SCHITTENHELM, H. G. SCHEEL-WALTER, et al.: Enhanced Erythrocyte Apoptosis in Sickle Cell Anemia, Thalassemia and Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency, **2002**, 12(5-6), s. 365-372. DOI: 10.1159/000067907.
37. LANG, K. S., P. A. LANG, C. BAUER, C. DURANTON, T. WIEDER, et al.: Mechanisms of Suicidal Erythrocyte Death, **2005**, 15(5), s. 195-202. DOI: 10.1159/000086406.
38. LANG, P. A., M. SCHENCK, J. P. NICOLAY, J. U. BECKER, D. S. KEMPE, et al.: Liver cell death and anemia in Wilson disease involve acid sphingomyelinase and ceramide, **2007**, 13(2), s. 164-170. DOI: 10.1038/nm1539.
39. LANG, P. A., O. BERINGER, J. P. NICOLAY, O. AMON, D. S. KEMPE, et al.: Suicidal death of erythrocytes in recurrent hemolytic uremic syndrome, **2006**, 84(5), s. 378-388. DOI: 10.1007/s00109-006-0058-0.
40. LANG, P. A., D. S. KEMPE, V. TANNEUR, K. EISELE, B. A. KLARL, et al.: Stimulation of erythrocyte ceramide formation by platelet-activating factor, **2005**, 118(6), s. 1233-1243. DOI: 10.1242/jcs.01730.
41. LAWEN, A.: Apoptosis – an introduction, **2003**, 25(9), s. 888-896. DOI: 10.1002/bies.10329.
42. LI, H., G. LYKOTRAFITIS, J. R. COLINA, L. F. AGUILAR, M. JEMIOLA-RZEMINSKA, et al.: Two-Component Coarse-Grained Molecular-Dynamics Model for the Human Erythrocyte Membrane, **2012**, 102(1), s. 75-84. DOI: 10.1016/j.bpj.2011.11.4012.

43. MALHI, H., M. E. GUICCIARDI a G. J. GORES: Hepatocyte Death: A Clear and Present Danger, **2010**, 90(3), s. 1165-1194. DOI: 10.1152/physrev.00061.2009.
44. MOHANDAS, N. a W. GRONER: Cell Membrane and Volume Changes during Red Cell Development and Aging, **1989**, 554, s. 217-224. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1989.tb22423.x.
45. MOHANDAS, N., P. G. GALLAGHER, J. R. COLINA, L. F. AGUILAR, M. JEMIOLA-RZEMINSKA, et al.: Red cell membrane past, present, and future, **2008**, 112(10), s. 3 939-3 948. DOI: 10.1182/blood-2008-07-161166.
46. MYSSINA, S., S. M. HUBER, C. BIRKA, P. A. LANG, K. S. LANG, et al.: Inhibition of Erythrocyte Cation Channels by Erythropoietin, **2003**, 14(11), s. 2750-2757. DOI: 10.1097/01.ASN.0000093253.42641.C1.
47. NEGRONI, A., S. CUCCHIARA a L. STRONATI: Apoptosis, Necrosis, and Necroptosis in the Gut and Intestinal Homeostasis, **2015**, s. 1-10. DOI: 10.1155/2015/250762.
48. PENKA, M. a E. TESAŘOVÁ: Hematologie a transfuzní lékařství: Hematologie, Grada, **2011**, 1. vydání, s. 208. ISBN 978-80-247-3459-0.
49. PETIT, K., M. SUWALSKY, J. R. COLINA, L. F. AGUILAR, M. JEMIOLA-RZEMINSKA, et al.: In vitro effects of the antitumor drug miltefosine on human erythrocytes and molecular models of its membrane. Biochimica et Biophysica Acta (BBA), **2019**, 1861(1), s. 17-25. DOI: 10.1016/j.bbamem.2018.10.009.
50. PRETORIUS, E., J. N. DU PLOOY a J. BESTER: A Comprehensive Review on Eryptosis, **2016**, 39(5), s. 1977-2000. DOI: 10.1159/000447895.
51. PROSKURYAKOV, S. Y., A. G. KONOPLYANNIKOV a V. L. GABAI: Necrosis: a specific form of programmed cell death?, **2003**, 283(1), s. 1-16. DOI: 10.1016/S0014-4827(02)00027-7.
52. PYRSHEV, K. A., A. S. KLYMCHENKO, G. CSÚCS a A. P. DEMCHENKO: Apoptosis and eryptosis: Striking differences on biomembrane level, **2018**, 1860(6), s. 1362-1371. DOI: 10.1016/j.bbamem.2018.03.019.

53. QADRI, S. M., R. BISSINGER, Z. SOLH a P. A. OLDENBORG: Eryptosis in health and disease: A paradigm shift towards understanding the (patho)physiological implications of programmed cell death of erythrocytes. *Blood Reviews*, **2017**, 31(6), s. 349-361. DOI: 10.1016/j.blre.2017.06.001.
54. RAY, S. D., N. YANG, S. PANDEY, N. T. BELLO a J. P. GRAY: Apoptosis. Reference Module in Biomedical Sciences, Elsevier, **2019**, s. 287-294.
55. RENEHAN, A. G., C. BOOTH a C. S. POTTEN: What is apoptosis, and why is it important? **2001**, 322(7301), s. 1536-1538. DOI: 10.1136/bmj.322.7301.1536.
56. REPSOLD, L. a A. M. JOUBERT: An Erythrocyte's Suicidal Type of Cell Death, **2018**, s. 1 – 10. DOI: 10.1155/2018/9405617.
57. RICE, L. a C. ALFREY: The Negative Regulation of Red Cell Mass by Neocytolysis: Physiologic and Pathophysiologic Manifestations, **2005**, 15(6), s. 245-250. DOI: 10.1159/000087234.
58. ROCK, K. L. a H. KONO: The Inflammatory Response to Cell Death, **2008**, 3(1), s. 99-126. DOI: 10.1146/annurev.pathmechdis-3.121806.151456.
59. SCHNEIDER, J., J. P. NICOLAY, M. FÖLLER, T. WIEDER a F. LANG: Suicidal Erythrocyte Death Following Cellular K⁺ Loss, **2006**, 20(1-4), s. 35-44. DOI: 10.1159/000104151.
60. THOMPSON, C. B.: Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease, **1995**, 267(5203), s. 1456-1462. DOI: 10.1126/science.7878464.
61. VAN BRUGGEN, R.: CD47 functions as a removal marker on aged erythrocytes, **2013**, 8(1), s. 153-156. DOI: 10.1111/voxs.12038.
62. VAUX, D. L.: Apoptosis and toxicology—what relevance? **2002**, 181-182, s. 3-7. DOI: 10.1016/S0300-483X(02)00248-2.
63. VIEHMANN, S. F., A. M. C. BÖHNER, C. KURTS a S. BRÄHLER: The multifaceted role of the renal mononuclear phagocyte system, **2018**, 330, s. 97-104. DOI: 10.1016/j.cellimm.2018.04.009.
64. VITTORI, D., D. VOTA a A. NESSE: Erythrocyte: Programmed Cell Death, **2012**, s. 21-38. ISBN 978-953-51-0138-3.

65. YAWATA, Y.: Cell membrane: The red blood cell as a model, Wiley-VCH, **2003**, 1. vydání, s. 439. ISBN 35-273-0463-0.
66. ZWAAL, R. F. A., P. COMFURIUS a E. M. BEVERS: Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells, **2005**, 62(9), s. 971-988. DOI: 10.1007/s00018-005-4527-3.