VLIV BAKTERIÍ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* A *STREPTOCOCCUS UBERIS* NA MORFOLOGICKÉ PROJEVY APOPTÓZY NEUTROFILNÍCH GRANULOCYTŮ MLÉČNÉ ŽLÁZY SKOTU *IN VITRO*

T. Langrová, Z. Sládek, D. Ryšánek

Došlo: 17. února 2005

Abstract

LANGROVÁ, T., SLÁDEK, Z., RYŠÁNEK, D.: *The effect of the bacterial pathogens Staphylococcus aureus and Streptococcus uberis on morphological features of apoptosis of heifers mammary gland neutrophils*. Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun., 2005, LIII, No. 4, pp. 61-74

The aim of the student thesis was to review the effect of the significant bacterial pathogens, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus uberis* on programmed cell death – apoptosis *in vitro*, and to determine the dynamic of morphological changes during aging neutrophil granulocytes of heifers mammary gland *in vitro*. Using light and electron microscopy we have noted characteristic alterations of apoptotic neutrophils. These are running in three consequential phases. We found out, that the interaction of bacterial pathogens with neutrophils during the incubation have lead in expressive quantitative and qualitative changes in apoptotic cells proportion. Concretely, the influence of both pathogens on mammary gland neutrophils caused the defer of apoptosis expression. Here, *S. aureus* caused lower number of apoptotic neutrophils in comparison with *S. uberis*. The outcomes testified, that *S. aureus* and *S. uberis* interaction with heifers mammary gland neutrophils *in vitro* causes alterations relating to apoptosis of these cells. Looking at the results of the study, we can conclude, that the pathogens *S. aureus* and *S. uberis* are not only significant heifers mammary gland – affection causers, but they significantly influence the cells of defensive system in their functions too. They significantly decrease the appearance of morphological apoptosis manifestations on neutrophils of tissue pool of the heifers mammary gland. The numbers of apoptotic cells in neutrophil population confirm, that during the interaction with mentioned pathogens the defer of morphological apoptosis manifestations happens. Then, higher number of apoptotic neutrophils in stages of apoptotic corpuscles implies increasing dynamic of this process. Beside that, the dynamic of apoptotic process is influenced by the specificity of certain bacterious actor too.

programmed cell death – apoptosis, polymorfonuclear leukocyte

Neutrofilní granulocyty (dále neutrofilny) hrají významnou úlohu v imunitě, neboť jsou odpovědné především za nespecifickou obranu těla proti pronikajícím mikroorganismům, virům, bakteriím, plísním, aj. V dutinovém systému mléčné žlázy představují neutrofilny jeden z typů volných buněk. Funkcí těchto buněk je eliminace bakteriálních patogenů během akut-

ního zánětu. V průběhu jeho iniciální fáze dochází k migraci těchto buněk z krve a k jejich následné akumulaci v dutinovém systému mléčné žlázy. Tato zá-
nětlivá reakce mléčné žlázy má za cíl eliminovat patogenní mikroorganismy prostřednictvím fagocytózy, a proto představuje důležitý obranný mechanismus (PAAPE a WERGIN, 1977).

Neutrofily obsahují v cytoplazmě granula s arzenálem enzymů určeným k ničení a intracelulárnímu trávení fagocytovaných bakterií. Granula však představují dvojsečnou zbraň, neboť v případě nekrózy neutrofilů dochází k vylití jejich obsahu do okolí, což působí histotoxicky na tkáň mléčné žlázy (Capuco et al., 1986). Alternativně k nekróze podstupují neutrofily programovanou buněčnou smrt – apoptózu, při níž nedochází k lytickému zániku buňky. Apoptotické neutrofily udržují buněčnou integritu a jsou fagocytovány lokálními makrofágy. Tímto způsobem jsou promptně fyzicky eliminovány z místa zánětu, tedy z dutinového systému mléčné žlázy (SLÁDEK a RYŠÁNEK, 2000). Na druhé straně však dochází u apoptotických neutrofilů ke snížení fundamentálních funkcí, zejména fagocytózy bakterií (WHYTE et al., 1993). Není tedy divu, že jedním z faktorů virulence bakterií je právě indukce apoptotického programu u neutrofilů, což tyto buňky funkčně diskvalifikuje, čímž se snižuje obranyschopnost makroorganismu (DeLEO, 2004).

Bylo zjištěno, že interakce veterinárně významných bakterií, *Haemophilus somnus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* s neutrofily vede k apoptóze (ENGELICH et al., 2001; LUNDQVIST–GUSTAFSSON et al., 2001; KOBAYASHI et al., 2003). To má za následek pokles podílu živých buněk v zanícené tkáni, jež by byly schopny eliminovat zmíněné bakterie a eradikovat infekci.

Doposud byla v této souvislosti odhalena role apoptózy u patogeny akutního zánětu mléčné žlázy způsobeného Gram–negativními bakteriemi *Escherichia coli* (VAN OOSTVELDT et al., 2001, 2002). Je s podivem, že u tak významných Gram–pozitivních původců mastitid, jako je *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus uberis*, však nikoliv. Vliv těchto bakteriálních patogenů mléčné žlázy na modulaci apoptózy neutrofilů tedy není znám.

Proto se cílem práce stalo posoudit vliv významných bakteriálních patogenů, *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus uberis*, na morfologické projevy programované buněčné smrti – apoptózy neutrofilů mléčné žlázy skotu *in vitro*.

MATERIÁL A METODIKA

Experimentální zvířata

Pokus byl realizován na osmi klinicky zdravých jalovicích, kříženkách holštýnského a českého strakatého plemene ve věku 14–18 měsíců. Byly vyšetřeny 4 mléčné žlázy každé jalovice, tedy celkem 32 mléčných žláz. Mléčné žlázy byly nejprve podrobeny klinickému vyšetření se zaměřením na posouzení morfologie vemene, utváření jednotlivých struků a zvláště průchodnosti strukových kanálků. Výsledky klinického vyšetření mléčných žláz a bakteriologického

vyšetření jejich laváží byly směrodatné pro zařazení zvířete k realizaci pokusu.

Model indukovaného influxu buněk

Mléčné žlázy byly důkladně desinfikovány etylalkoholem, zvláště v okolí zevního ústí strukového kanálku, a následně podrobeny laváží (RYŠÁNEK et al., 1999). Laváž byla provedena pomocí upravených ureterálních katetrů (AC5306CH06, Porges S. A., France) sterilním pufrovaným fyziologickým roztokem (PBS, pH 7,4; 0,01 M, NaCl 0,138 M; KCL 0,0027 M, připraveným z apyrogenní vody) o objemu 20 ml, ohřátým na 37 °C. Poté následovala intramamární aplikace sterilního syntetického derivátu muramyllopeptidu (MurNAc–L–Abu–D–IsoGln, Institut Organické chemie a biochemie Akademie věd, Praha, Česká republika) ve finální koncentraci 500 µg v 10 ml PBS. Po 18 hodinách byly mléčné žlázy vypláchnuty 20 ml sterilním PBS, ohřátým na teplotu 37 °C.

Zpracování buněčné suspenze

Získané laváže byly ihned po odběru posouzeny aspekty a poté z nich byly odebrány vzorky pro bakteriologické vyšetření, pro stanovení celkového počtu buněk a pro stanovení vitality buněk.

Bakteriologické vyšetření bylo provedeno kultivací na krevní agar s 5 % propraných beraních erytrocytů a aerobní kultivací při 37 °C po dobu 24 hodin (QUINN et al., 1994). Všechny vyšetřené mléčné žlázy byly bakteriologicky negativní, neboť žádné kolonie bakterií nebyly na krevním agaru vykultivovány.

Celkový počet buněk v laváží každé mléčné žlázy byl stanoven použitím přístroje Fossomatic 90 (Foss Electric, Denmark) procedurou podle doporučení Mezinárodní mlékařské federace (IDF, 1995).

Vitalita buněk v lavážích byla hodnocena testem vylučování trypanové modři (JAIN a JASPER, 1967) počítáním 200 buněk z každé mléčné žlázy. Ve všech vyšetřovaných lavážích mléčných žláz před a po indukci influxu byla vitalita buněk vždy vyšší než 96 %.

Příprava *S. aureus* a *S. uberis*

Ke studii byly použity *S. aureus* (kmen Newbould 305 CCM 6275) a *S. uberis* (kmen CCM 4617). Inokula těchto bakterií byla připravena postupem popsaným dříve (SLÁDEK et al., 2005).

Kultivace neutrofilů

Čerstvé neutrofily z laváží mléčné žlázy byly adjustovány ($1,2 \times 10^7$ buněk/ml) v RPMI 1640 médiu (Sigma, MO, USA) pomocí hemocytometru. Obdobně byly adjustovány i bakteriální suspenze ($1,2 \times 10^7$ buněk/ml) *S. aureus* a *S. uberis*. Buněčné a bakteriální suspenze byly smíchány v objemovém poměru

1 : 1. Finální koncentrace buněk i bakterií tedy činila $6 \times 10^6/\text{ml}$. Jako kontrola sloužila pouze buněčná suspenze bez bakterií v konečném ředění $6 \times 10^6/\text{ml}$. Pro analýzu buněk ve světelném mikroskopu byla zhotovena podložní skla s adhezaními neutrofily nanesením suspenzí ($0,5 \text{ ml/sklíčko}$) v duplikátech a inkubací po dobu tří hodin ve vlhké komůrce. Kultivace proběhla v termostatu při 37°C a 5% atmosféře CO_2 (SAVILL et al., 1989).

Světelná mikroskopie

Po vyjmutí z termostatu byla sklíčka barvena panoptickým barvením dle Pappenheima. V populaci neutrofilů byly morfologicky stanoveny podíly jednotlivých stadií apoptózy počítáním přinejmenším 200 apoptotických neutrofilů. Obarvená skla byla hodnocena světelným mikroskopem JENAMED 250 CF (Carl Zeiss, Jena, Německo) vybaveným barevnou kamerou 3-CCD HV-C20 (HITACHI DENSHI, Japan) a zpracovány softwarem pro analýzu obrazu LUCIA G (LABORATORY IMAGING, Prague, Czech Republic).

Transmisní elektronová mikroskopie

Zpracování vzorků pro transmisní elektronovou mikroskopii (TEM) bylo provedeno postupem popsaným dříve (SLÁDEK a RYŠÁNEK, 1999) na pracovišti elektronové mikroskopie Ústavu histologie a embryologie Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně.

Buňky byly fixovány 2 hodiny v 3% glutaraldehydu zředěném v kakolydátovém pufru a následně třikrát promyty po 30 min v 0,1 M kakolydátovém pufru. Poté byly postfixovány v 0,02 M OsO_4 rozpuštěném v 0,1 M kakolydátovém pufru, dehydratovány v alkoholu a prosyceny acetone a Durcupanem I přes noc. Následujícího dne byly buňky prosyceny, stabilizovány a polymerizovány Durcupanem II. Ultratenké řezy o síle 90 nm zhotovené na ultramikrotomu (Ultramicrotome LKB, Bromma, Sweden) byly přemístěny na mřížku povlečenou formvarovou blánou. Ke kontrastnímu barvení byl použit 2% uranyl acetát a Reynoldsův roztok. Ultratenké řezy byly pozorovány v transmisním elektronovém mikroskopu TESLA BS 500 (Tesla a.s., Brno, Česká republika) při pracovním napětí 60 kV. Elektronogramy byly digitalizovány scannerem UMAX ASTRA 1200S (Umax Technologies, Inc., Fremont, USA) a vyhodnoceny softwarem pro analýzu obrazu LUCIA G (Laboratory Imaging, Praha, Česká republika).

Statistika

Podíly jednotlivých stadií apoptózy neutrofilů jsou prezentovány jako průměry a směrodatné odchylky

32 vyšetřených mléčných žláz. Významnost rozdílů v zastoupení jednotlivých stadií apoptózy neutrofilů byla hodnocena párovým t-testem. Ke statistickému zpracování dat byl použit STAT Plus software (MATOUŠKOVÁ et al., 1993).

VÝSLEDKY

Buňky indukovaného influxu

Indukovaným influxem byla získána buněčná populace s celkovým počtem buněk $59,1 \pm 11,2 \times 10^6/\text{ml}$. Tato populace buněk byla zastoupena relativně vysokým podílem neutrofilů ($90,1 \pm 11,8\%$) nad makrofágy ($7,3 \pm 4,6\%$) a lymfocyty ($2,6 \pm 1,1\%$). V populaci neutrofilů dominovaly strukturálně a ultrastrukturálně normální buňky. Vedle těchto neutrofilů byly zaznamenány rovněž neutrofily s morfologickými znaky apoptózy ($8,4 \pm 3,1\%$).

Světelná mikroskopie

Strukturálně normální neutrofily byly charakterizovány protáhlým, ovoidním či nepravidelným tvarem s laločnatým jádrem vyplněným jemně zrnitým euchromatinem a denzním heterochromatinem. Cytoplazma obsahovala hojně azurofilní a specifické granule, četné mitochondrie a protáhlé cisterny endoplazmatického retikula. V jemně zrnité matrix cytoplazmy byly patrné ribosomy a polyribosomy. Na povrchu buněk byla přítomna pseudopodia (obr. 1).

V iniciálním stadiu apoptózy – karyopyknosis, byla na první pohled patrná výrazná redukce objemu buněk. Oproti strukturálně normálním neutrofilům (obr. 1) byly karyopyknotické neutrofily (obr. 2) téměř o polovinu menší v důsledku kondenzace cytoplazmy. Chromatin segmentů jádra podléhal rovněž kondenzaci a splýval v jeden sférický útvar – došlo k desegmentaci jádra. Kondenzované, karyopyknotické jádro se jevílo jako výrazně tmavý, téměř černě zbarvený objekt. Neutrofily zaujímaly v tomto stadiu apoptotických změn sférický tvar a byly intenzivně eosinofilní.

Ve druhém stadiu apoptózy neutrofilů, zeiosis, docházelo ke zpěnění cytoplazmatické membrány, kdy se vytvářely protuberance – „bublinky“. Jádro zeiotických neutrofilů s kondenzovaným chromatinem se rozdělilo do několika malých fragmentů (obr. 3).

Ve třetím, závěrečném stadiu apoptotických změn docházelo k formování apoptotických tělísek (obr. 4). V důsledku pokračující kondenzace jádra a cytoplazmy doprovázené zaškrcováním a následným oddělením vznikaly malé kulovité útvary s fragmentovaným jádrem a hustě kondenzovaným chromatinem – apoptotická tělíska (obr. 4).

1: *Strukturálně normální neutrofil tkáňového poolu mléčné žlázy skotu. Panoptické barvení dle Pappenheima, zvětšení 1000x.*

2: *Stadium karyopyknosis apoptotického neutrofilu, charakteristické fragmentací DNA jádra a přítomností vakuol v cytoplasmě. Panoptické barvení dle Pappenheima, zvětšení 1000x.*

3: *Apoptotický neutrofil ve stadium zeiosis. Panoptické barvení dle Pappenheima, zvětšení 1000x.*

4: *Apoptotické tělísko neutrofilu (vpravo) a normální neutrofil. Panoptické barvení dle Pappenheima, zvětšení 1000x.*

Transmisní elektronová mikroskopie

Ultrastrukturální vlastnosti apoptotických neutrofilů korespondovaly se strukturálními vlastnostmi apoptotických neutrofilů ve světelné mikroskopii. Ultrastrukturálně normální neutrofil znázorňuje obr. 5.

Stadium karyopyknosis charakterizoval sférický tvar buněk, slití jaderných segmentů, denzní chromatin, parciální absence granulí a mitochondrií v cytoplasmě. U karyopyknotických neutrofilů bylo možno pozorovat v cytoplasmě ploché cisterny endoplazmatického retikula a četné malé vakuoly segregované na periferii buněk. V cytoplasmě karyopyknotických neu-

trofilů se nacházely intaktní primární a sekundární granule (obr. 6).

Stadium zeiosis charakterizovaly segregované fragmenty jádra s pŕlměsíčitým denzním chromatinem, dislokované na periferii buněk. Dále bylo patrné formování povrchových „blebsů“ (prohlubní a záhyby) a bublin a jejich postupné odškrcování (obr. 7). Odškrcování těchto úseků mělo za následek vznik apoptotických tělísek.

Apoptotická tělíska představovala 2–3 μm veliké fragmenty buněk s vysoce kondenzovanými segmenty jádra a malým množstvím granulí v cytoplasmě (obr. 8).

5: Ultrastrukturálně normální neutrofily tkáňového poolu mléčné žlázy skotu. Transmisní elektronová mikroskopie, zvětšení 5000x.

6: Neutrofil ve stadiu karyopyknosis charakterizován jádrem s desegmentací laloků a přítomností intaktních granul v cytoplazmě. Transmisní elektronová mikroskopie, zvětšení 10000x.

7: Apoptotický neutrofil ve stadiu zeiosis. Transmisní elektronová mikroskopie, zvětšení 10000x.

8: Apoptotické tělíčko. Transmisní elektronová mikroskopie, zvětšení 10000x.

Apoptóza neutrofilů po in vitro kultivaci se *S. aureus* a *S. uberis*

Výchozí populace neutrofilů, použita k in vitro studii, obsahovala část buněk s morfologickými znaky apoptózy ($8,4 \pm 3,1$ %). Po třech hodinách kultivace došlo k výskytu spontánní apoptózy následkem stárnutí neutrofilů u $30,8 \pm 5,7$ % buněk.

Rozdíl v počtu všech apoptotických buněk před inkubací a po 3hodinové inkubaci byl statisticky vysoce významný ($P < 0,01$).

Při kultivaci neutrofilů s bakteriemi byly zaznamenány výrazné změny v zastoupení apoptotických buněk. Po 3hodinové inkubaci se *S. aureus* bylo zjištěno $10,9 \pm 4,4$ % apoptotických buněk a v případě *S. uberis* $14,6 \pm 4,3$ %. Celkový počet apoptotických buněk byl tedy oproti kontrole v případě obou bakterií statisticky vysoce významně nižší ($P < 0,01$). Uvedené údaje o zastoupení apoptotických neutrofilů uvádí obr. 9.

Apoptóza neutrofilů po inkubaci s bakteriemi *S. aureus*

Kultivace neutrofilů se *S. aureus* rezultovala ve výrazné změny nejen v zastoupení apoptotických bu-

něk, nýbrž rovněž v podílu jednotlivých stadií apoptózy. Jak dokumentuje obr. 10, během kultivace došlo ke statisticky významnému snížení počtu neutrofilů ve stadiu karyopyknosis ($P < 0,01$), ze $78,7 \pm 2,9$ % na $67,3 \pm 3,4$ %. Naproti tomu bylo zaznamenáno statisticky významné zvýšení počtu apoptotických tělísek ($P < 0,01$), z $8,1 \pm 1,0$ % na $19,3 \pm 2,3$ %. Ve stadiu zeiosis bylo zjištěno statisticky nevýznamné, pouze mírné zvýšení počtu z $13,2 \pm 2,8$ % na $13,4 \pm 1,7$ %.

Apoptóza neutrofilů po inkubaci s bakteriemi *S. uberis*

Podobně jako u *S. aureus* byla kultivace neutrofilů se *S. uberis* doprovázena výraznou změnou podílu jednotlivých stadií apoptózy buněk (obr. 11). V případě stadia karyopyknosis bylo pozorováno statisticky významné snížení počtu ($P < 0,01$), z $81,1 \pm 3,5$ % u kontroly na $69,7 \pm 6,6$ % u *S. uberis*. Ve stadiu zeiosis bylo zjištěno statisticky nevýznamné zvýšení počtu buněk, z $10,9 \pm 4,2$ % na $14,2 \pm 6,2$ %. Počet apoptotických tělísek se zvýšil statisticky velmi významně ($P < 0,01$), ze $7,9 \pm 3,1$ % na $16,1 \pm 1,1$ %.

9: Zastoupení apoptotických neutrofilů se *S. aureus* a *S. uberis*. Procento a směrodatné odchylky apoptotických neutrofilů po třech hodinách in vitro inkubace. Signifikantní rozdíly v zastoupení apoptotických neutrofilů mezi kontrolou a bakteriemi (* $P < 0,01$).

10: Zastoupení jednotlivých stadií apoptotických neutrofilů se *S. aureus*. Procento a směrodatné odchylky apoptotických neutrofilů po třech hodinách *in vitro* inkubace. Signifikantní rozdíly v zastoupení jednotlivých stadií apoptotických neutrofilů mezi kontrolou a bakteriemi *S. aureus* (* $P < 0,01$).

11: Zastoupení jednotlivých stadií apoptotických neutrofilů se *S. uberis*. Procento a směrodatné odchylky apoptotických neutrofilů po třech hodinách *in vitro* inkubace. Signifikantní rozdíly v zastoupení jednotlivých stadií apoptotických neutrofilů mezi kontrolou a bakteriemi *S. uberis* (* $P < 0,01$).

12: Porovnání podílu jednotlivých stadií apoptózy neutrofilů se *S. aureus* a *S. uberis*. Procento a směrodatné odchylky apoptotických neutrofilů po třech hodinách *in vitro* inkubace. Signifikantní rozdíly v zastoupení jednotlivých stadií apoptotických neutrofilů mezi kontrolou a bakteriemi (* $P < 0,01$).

Srovnání apoptózy neutrofilů po kultivaci s bakteriemi *S. aureus* a *S. uberis*

Porovnání intenzity interakce neutrofilů s bakteriemi uvádí následující obr.12. Jak je z něj patrné, statisticky významný rozdíl ($P < 0,01$) byl zaznamenán pouze v zastoupení apoptotických tělísek, $16,1 \pm 1,1\%$ u *S. uberis* a $19,3 \pm 2,3\%$ u *S. aureus*. Rozdíl v počtu buněk nacházejících se ve stadiu karyopyknosis po 3hodinové inkubaci s bakteriemi *S. uberis* a *S. aureus* byl statisticky nevýznamný, stejně jako počet buněk stadia zeiosis.

DISKUSE

Cílem práce bylo posoudit vliv významných bakteriálních patogenů, *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus uberis* na morfologické projevy programované buněčné smrti – apoptózy neutrofilů mléčné žlázy skotu *in vitro*.

Ke studiu byly použity migrované neutrofilů mléčné žlázy virginních jalovic, získané použitím modelu indukovaného influxu. Syntetický derivát muramylpeptidu (MDP) představuje bakteriální peptidoglykan izolovaný z buněčných stěn Gram-pozitivních bakterií, který disponuje chemotaktickými účinky. Právě jeho vlastnosti se staly podkladem pro navození reálných podmínek při indukci zánětlivé odpovědi mléčné žlázy na bakteriální infekci, neboť byly v následné *in vitro* studii použity Gram-pozitivní koky: *S. aureus* a *S. uberis*. Proto byla zánětlivá odpověď mléčné žlázy charakterizována mohutným influxem buněk, $59,1 \times 10^6/\text{ml}$, s 90% podílem neutrofilů.

Populace neutrofilů obsahovala v převážné míře strukturálně normální buňky. Vedle nich však byly zaznamenány neutrofilů s charakteristickými struktu-

rálními vlastnostmi apoptózy. Přítomnost apoptotických neutrofilů ve vstupní populaci buněk je zřejmě výsledkem dvou procesů a lze ji vysvětlit následovně. Intramamární aplikací prozánětlivého činitele – MDP dojde k indukci zánětlivé odpovědi, která je charakterizovaná masivním influxem neutrofilů do dutinového systému mléčné žlázy a jejich akumulací. Neutrofilů jsou k migraci rekrutovány v různém stádiu (COX et al., 1995) a navíc influx neutrofilů probíhá kontinuálně. Proto se již ve vstupní populaci neutrofilů lze setkat s neutrofilů s morfologickými projevy apoptózy.

Apoptóza buněk je charakteristická typickými morfologickými vlastnostmi, mezi které patří zejména svaštění buněk, kondenzace chromatinu (karyopyknosis), blebbing (zeiosis) a fragmentace do apoptotických tělísek (KERR et al., 1972). V této studii se tyto morfologické znaky staly kritériem pro analýzu dynamiky apoptózy neutrofilů mléčné žlázy skotu během kultivace těchto buněk *in vitro*.

Pro kultivaci *in vitro* byl použit model stárnutí neutrofilů, tzv. model „agingu“. Uvedený model zavedli PAYNE et al. (1994) ke studiu apoptózy neutrofilů v definovaných podmínkách *in vitro*. Autoři modelu prokázali, že proces apoptózy neutrofilů v podmínkách *in vitro* vykazuje shodné morfologické a biochemické vlastnosti, jako je tomu v podmínkách *in vivo* a *in situ*. Proto se model agingu stal frekventovaným metodickým prostředkem pro studium apoptózy krevních neutrofilů a její modulace (PAYNE et al., 1994). Stejně tak je tento model vhodný pro neutrofilů jiné provenience, jako neutrofilů skotu (VAN OOSTVELDT et al., 1999; SLÁDEK a RYŠÁNEK, 2002), malých přežvýkavců (TATARCZUCH et al., 2000),

prasete (MATALOVÁ et al., 2000) a psa (OGUMA et al., 2000).

Populace neutrofilů před kultivací obsahovala přibližně 8 % apoptotických buněk. Po třech hodinách kultivace došlo ke statisticky významnému nárůstu na 30 %. Porovnáme-li tento podíl s literárními údaji – krevními neutrofily skotu, zvýšení podílů apoptotických neutrofilů se zdá být relativně vysoké. VAN OOSTVELDT et al. (1999, 2001) totiž uvádějí, že po dvou hodinách kultivace dochází k projevům apoptózy u 3–5 % a po čtyřech hodinách u přibližně 15 % neutrofilů. Naproti tomu SLÁDEK et al. (2002) zaznamenali u neutrofilů tkáňového poolu mléčné žlázy skotu shodný podíl apoptotických neutrofilů jako v této práci. U krevních neutrofilů jiných druhů hospodářských zvířat je situace obdobná, MATALOVÁ et al. (2000) uvádějí pouze 2 % podíl apoptózy po 2hodinové kultivaci. Krevní neutrofily představují krátce žijící buňky, které vycestovávají z krevního řečiště do tkáně mléčné žlázy. Výsledky studií s použitím radioaktivně značených neutrofilů prokázaly, že doba migrace činí kolem dvou hodin. Tento čas je potřebný pro pevné přilnutí – adhezenci neutrofilních granulocytů ke stěně endotelu postkapilární veny, pro migraci mezi endotelálními buňkami diapedezi, migraci skrze intercelulární matrix subepiteliální lamina propria, a konečně migraci přes epitelální výstelku strukové cisterny do sekretu mléčné žlázy (KEHRLI a SHUSTER, 1994). Popsaná aktivita neutrofilů se s vysokou pravděpodobností podílí na snížení životnosti těchto buněk. VAN OOSTVELDT et al. (2002) zaznamenali proapoptotický vliv diapedese u krevních neutrofilů. Na druhé straně WATSON et al. (1997) prokázali, že transmigrace skrze endotel oddaluje projevy apoptózy neutrofilů. Zdá se, že nejen diapedese a transmigrace, nýbrž i mikroenvironment dutinového systému mléčné žlázy bude výrazným způsobem modulovat životní funkce neutrofilů.

Mezi nejvýznamnější Gram-pozitivní bakteriální patogeny patří *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus uberis*. *S. aureus* představuje majoritní patogen, který způsobuje klinické a subklinické mastitidy doprovázené vážnými ekonomickými ztrátami (FOX a GAY, 1993). *S. uberis* je nejčastěji se vyskytující environmentální patogen, způsobující významný podíl intramamárních infekcí u laktujících i nelaktujících dojců (PEDERSEN et al., 2003). Vzhledem k uvedeným skutečnostem se oba inkriminované patogeny staly předmětem studia v této práci.

Bylo zjištěno, že interakce těchto bakterií s neutrofily během inkubace rezultovala ve výrazné kvantitativní a kvalitativní změny v zastoupení apoptotických buněk. Konkrétně vyústila interakce neutrofilů mléčné žlázy s oběma patogeny během kultivace v oddálení projevů apoptózy. Přičemž interakce *S. aureus* rezultovala v nižší počty apoptotických neu-

trofilů, než u *S. uberis*. Jak ukázaly výsledky morfolo-
gické analýzy, po třech hodinách inkubace bylo za-
znamenáno pouze cca 10 % apoptotických neutrofilů
u *S. aureus* a 14 % u *S. uberis*. V kontrole (tedy mé-
diu bez přítomných patogenů) bylo však detekováno
30 % apoptotických neutrofilů. Z literatury je patrné,
že během kultivace neutrofilů s bakteriemi dochází
k modulaci apoptózy účinkem bakteriálních toxinů a
produktů, fyzického kontaktu bakterií a následné fa-
gocytózy. Uvedené stupně interakce buněk obranného
systému s prokaryonty pak rezultují v apoptózu, jak
bylo prokázáno u významných humánních a animál-
ních patogenů. Například leukotoxin *Fusobacterium
necrophorum* (STEWENS a CZUPRINSKI, 1996;
NARAYANAN et al., 2002) a enterotoxin *S. aureus*
(MOULDING et al., 1999) indukují apoptózu neu-
trofilů. Dále interakce samotných bakterií, *Haemophilus
sommus*, *S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus
pyogenes* s neutrofily vede k apoptóze (ENGELICH et al., 2001; LUNDQVIST–GUSTAFSSON
et al., 2001; KOBAYASHI et al., 2003; DeLEO, 2004).
Bylo prokázáno, že nakonec i samotná fago-
cytóza bakterií *Candida albicans*, *Escherichia coli*,
S. aureus, *Streptococcus pneumoniae*, může rezulto-
vat v následnou apoptózu neutrofilů (WATSON et al.,
1996; ROTSTEIN et al., 2000; YAMAMOTO et al.,
2002; DeLEO, 2004).

Rozdíl ve výsledcích této práce a výše citovaných
studií zřejmě souvisí s použitými metodami detekce
apoptózy. Zatímco v této práci byla k detekci apo-
ptózy použita metoda morfolo-
gická, v uvedených
studiích to byla zejména metoda průkazu transloko-
vaného fosfatidylserinu. Při studiu dynamiky apo-
ptózy, zvláště u murinních a humánních buněk, bylo
zjištěno, že translokace fosfatidylserinu představuje
relativně časný jev, který předchází fragmentaci
DNA (MARTIN et al., 1995; STUART et al., 1998).
Tomu plně odpovídají výsledky zjištěné pomocí prů-
tokové cytometrie na stejném experimentálním ma-
teriálu, kdy bylo zjištěno, že interakce *S. aureus* a *S.
uberis* s neutrofily vedou ke snížení karyopyknózy a
zároveň ke zvýšení podílu buněk s translokovaným
fosfatidylserinem (SLÁDEK et al., 2005). Je tedy
zřejmé, že použitá délka inkubace patogenů s neu-
trofily nerezultuje v plné vyvinutí příznaků apoptózy
daných jak biochemickými, tak zároveň morfolo-
gickými znaky.

Rozdíl v zastoupení apoptotických neutrofilů byl
zaznamenán rovněž mezi samotnými patogeny. Po in-
terakci neutrofilů se *S. aureus* byl zaznamenán nižší
podíl apoptotických buněk, než u *S. uberis*. Tato sku-
tečnost zřejmě souvisí s rozdílnou virulencí těchto
patogenů. Mezi významné faktory virulence *S. au-
reus* patří povrchové komponenty (adhesiny, protein
A a polysacharidy kapsuly), toxiny, extracelulární
enzymy a koaguláza V (Sutra a Poutrel, 1994). S tím

souvisí skutečnost, že lze očekávat razantnější odezvu buněk obranného systému mléčné žlázy po interakci s *S. aureus*. Nutno však podotknout, že modulace apoptózy neutrofilů *S. aureus* nebyla doposud studována na relevantním materiálu. Proto nelze souvislost virulence *S. aureus* s indukcí apoptózy neutrofilů mléčné žlázy potvrdit.

Z výše uvedených dat lze vyvodit, že interakce neutrofilů s oběma patogeny *in vitro* vede k oddálení nástupu morfologických projevů apoptózy. Snížení podílu karyopyknózy a zvýšení podílu apoptotických tělísek naznačuje vyšší dynamiku procesu apoptózy u těch neutrofilů, u kterých již apoptóza nastala.

Patogeny *S. aureus* a *S. uberis* tvoří nejen významné původce onemocnění mléčné žlázy skotu, nýbrž i významně ovlivňují fyziologické funkce buněk obranného systému organismu. Dynamika procesu apoptózy je významně ovlivněna rovněž specifitou daného bakteriálního činitele. Práce tedy odhalila významné biologické činitele modulující životnost buněk obranného systému mléčné žlázy.

Práce však v žádném případě nepředstavuje ukončenou etapu studia interakce buněk obranného systému mléčné žlázy s bakteriálními patogeny, avšak naopak otvírá prostor pro studie zaměřené na apoptózu neutrofilů v patogenezí infekčního zánětu mléčné žlázy skotu.

SOUHRN

Cílem studie bylo posoudit vliv významných bakteriálních patogenů, *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus uberis* na expresi programované buněčné smrti – apoptózy *in vitro* a stanovit dynamiku morfologických změn během procesu stárnutí neutrofilních granulocytů tkáňového poolu mléčné žlázy skotu *in vitro*. S použitím světelné a transmisní elektronové mikroskopie byly zaznamenány charakteristické změny apoptotických neutrofilů, které probíhaly ve třech na sebe navazujících stádiích. Bylo zjištěno, že interakce bakteriálních patogenů s neutrofilů během inkubace vede k výrazným kvalitativním a kvantitativním změnám v zastoupení apoptotických buněk. Oba patogeny způsobují u neutrofilů mléčné žlázy opoždění projevů apoptózy. Výsledky potvrdily, že interakce *S. aureus* a *S. uberis* s neutrofilů tkáňového poolu mléčné žlázy skotu *in vitro* způsobují změny týkající se apoptózy těchto buněk. Z výsledků práce lze vyvodit, že *S. aureus* a *S. uberis* jsou nejen významnými patogeny způsobujícími infekce mléčné žlázy, ale ovlivňují i buňky obranného systému mléčné žlázy a jejich funkci. Výrazně snižují počet buněk s morfologickými projevy apoptózy neutrofilů tkáňového poolu mléčné žlázy skotu. Počet apoptotických buněk v populaci neutrofilů potvrzuje, že interakce obou patogenů vede k oddálení nástupu morfologických projevů apoptózy. Vyšší počet apoptotických tělísek naznačuje rostoucí dynamiku tohoto procesu, která je rovněž ovlivněna specifikou bakterie.

programovaná buněčná smrt – apoptóza, polymorfonukleární leukocyty

LITERATURA

- CAPUCO, A. V., PAAPE, M. J., NICKERSON, S. C.: *In vitro* study of polymorphonuclear leukocyte damage to mammary tissue of lactating cows. American Journal of Veterinary Research, 1986. 47, 663-669.
- COX, G., CROSSLEY, J., XING, Z.: Macrophage engulfment of apoptotic neutrophils contributes to the resolution of acute pulmonary inflammation *In vivo*. American Journal of Respiratory Cell Molecular Biology, 1995. 12: 232-237.
- DeLEO, F. R.: Modulation of phagocyte apoptosis by bacterial pathogens. Apoptosis 9, 2004. 399-413.
- ENGELICH, G., WHITE, M., HARTSHORN, K. L.: Neutrophil survival is markedly reduced by incubation with influenza virus and *Streptococcus pneumoniae*: role of respiratory burst. J Leukoc Biol., 2001. 69: 50-6.
- FOX, L. K., GAY, J. M.: Contagious mastitis. Vet. Clin. North Am. Food Anim., 1993. 59: 475-487.
- IDF, International Dairy Federation, Milk – Enumeration of somatic cells. International IDF Standard 148A, (1995) 8 s.
- JAIN, N. C., JASPER, D. E.: Viable cells in bovine milk. British Veterinary Journal, 1967. 123: 57-63.
- KEHRLI, M. E. Jr., SHUSTER, D. E.: Factors affecting milk somatic cells and their role in health of the bovine mammary gland. J Dairy Sci., 1994. 77: 619-27.
- KERR, J. F. R., WYLLIE, A. H., CURRIE, A. R.: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. British Journal of Cancer, 1972. 68: 239-257.

- KOBAYASHI, S. D., VOYICH, J. M., DeLEO, F. R.: Regulation of the neutrophil-mediated inflammatory response to infection. *Microb. Infect.* 5, 2003. 1337-1344.
- LUNDQVIST-GUSTAFSSON, H., NORRMAN, S., NILSSON, J., WILSSON, A.: Involvement of p38-mitogen-activated protein kinase in *Staphylococcus aureus*-induced neutrophil apoptosis. *J. Leukoc. Biol.*, 2001. 70: 642-648.
- MARTIN, S. J., REUTELINGSPERGER, C. P., MCGAHON, A. J., RADAR, A., VAN-SCHIE, R. C., LAFACE, D. M., GREEN, D. R.: Early distribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *Journal of Experimental Medicine*, 1995. 182: 1545-1556.
- MATALOVÁ, E., ŠPANOVÁ, A., KOVÁŘŮ, F., HEROLDOVÁ, M.: Apoptosis activation in pig leukocytes after phagocytosis of *Salmonella typhimurium* LB 5000. *Acta Veterinaria Brno*, 2000. 69: 11-15.
- MATOUŠKOVÁ, O., CHALUPA, J., CIGLER, M., HRUŠKA, K.: STAT Plus, software manual 1. 01. 1992, Veterinary Research Institute, Brno, 1-168.
- MOULDING, D. A., WALTER, C., HART, C. A., EDWARDS, S. W.: Effects of staphylococcal enterotoxins on human neutrophil function and apoptosis. *Infection and Immunity*, 1999. 67: 2312-2318.
- NARAYANAN, S., STEWART, G. C., CHENGAPPA, M. M., WILLARD, L., SHUMAN, W., WILKERSON, M., NAGARAJA, T. G.: *Fusobacterium necrophorum* leukotoxin induces activation and apoptosis of bovine leukocytes. *Infect. Immun.*, 2002. 70: 4609-4620.
- OGUMA, K., KANO, R., HASEGAWA, A.: *In vitro* study of neutrophil apoptosis in dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2000. 76: 157-62.
- PAAPE, M. J., WERGIN, W. P.: The leukocyte as a defense mechanism. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 1977. 170: 1214-1223.
- PAYNE, C. L., GLASSER, L., TISCHLER, M. E., WYCKOFF, D., CROMEY, D., FIEDERLEIN, R., BOHNERT, O.: Programmed cell death of the normal human neutrophil: An *in vitro* model of senescence. *Microscopy research and technique*, 1994. 28: 327-344.
- PEDERSEN, L. H., AALBAEK, B., RONTVED, C. M., INGVAERTSEN, K. L., SORENSEN, N. S., HEGGAARD, P. M., JENSEN, H. E.: Early pathogenesis and inflammatory response in experimental bovine mastitis due to *Streptococcus uberis*. *J. Comp. Pathol.*, 2003. 128: 156-164.
- QUINN, P. J., CARTER, M. E., MARKEY, M., CARTER, G. R.: Clinical veterinary microbiology. MOSBY, London, 1994. 118-345.
- RYŠÁNEK, D., ŠEDIVÁ, A., SLÁDEK, Z., BABÁK, V.: Vliv antimikrobiálních látek na indukci apoptózy a nekrózy polymorfonukleárních leukocytů v rezoluci zánětu mléčné žlázy skotu. Výzkumný projekt GAČR, 524/01/1290. 2001-2003.
- SAVILL, J. S., WILLIE, A. H., HENSON, J. E., WALPORT, M. J., HENSON, P. M., HASLETT, C.: Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *Journal of Clinical Investigation*, 1989. 83: 865-867.
- SLÁDEK, Z., RYŠÁNEK, D.: Apoptóza polymorfonukleárních leukocytů. *Veterinary Medicine Czech*, 1999. 44: 309-320.
- SLÁDEK, Z., RYŠÁNEK, D.: Morphology of apoptosis of polymorphonuclear leukocytes isolated from juvenile bovine mammary glands. *Veterinary Medicine Czech*, 2000. 45: 71-81.
- SLÁDEK, Z., RYŠÁNEK, D., FALDYNA, M.: Activation of phagocytes during initiation and resolution of mammary gland injury induced by lipopolysaccharide. *Veterinary Research*, 2002. 33: 191-204.
- SLÁDEK, Z., RYŠÁNEK, D., FALDYNA, M.: Effect of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus uberis* on apoptosis and necrosis of bovine mammary gland tissue pool neutrophils *in vitro*. *Veterinary Medicine Czech*, 2005. 50: 1-11.
- STEWENS, P. K., CZUPRYNSKI, C. J.: *Pasteurella haemolytica* leukotoxin induces bovine leukocytes to undergo morphologic changes consistent with apoptosis *in vitro*. *Infection and Immunity*, 1996. 64: 2687-2694.
- STUART, M. C., DAMOISEAUX, J. G., FREDERIK, P. M., ARENDS, J. W., REUTELINGSPERGER, C. P.: Surface exposure of phosphatidylserine during apoptosis of rat thymocytes precedes nuclear changes. *European Journal of Cell Biology*, 1998. 76: 77-83.
- SUTRA, L., POUTREL, B.: Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.*, 1994. 40: 79-89.
- TATARCZUCH, L., PHILIP, C., BISCHOF, R., LEE, C. S.: Leucocyte phenotypes in involuting and fully involuted mammary glandular tissues and secretions of sheep. *J. Anat.*, 2000. 196: 313-26.
- VAN OOSTVELDT, K., VANGROENWEGHE, F., DOSOGNE, H., BURVENICH, C.: Apoptosis and necrosis of blood and milk polymorphonuclear leukocytes in early and midlactating healthy cows. *Vet. Res.*, 2001. 32: 617-22.
- VAN OOSTVELDT, K., TOMITA, G. M., PAAPE, M. J., CAPUCO, A. V., BURVENICH, C.: Apoptosis of bovine neutrophils during mastitis experimentally induced with *Escherichia coli* or endotoxin. *Am J Vet Res.*, 2002. 63: 448-53.

- VAN OOSTVELDT K., DOSOGNE, H., BURVENICH, C., PAAPE, M. J., BROCHEZ, V., Van den EECKHOUT, E.: Flow cytometric procedure to detect apoptosis of bovine polymorphonuclear leukocytes in blood. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1999. 70: 125-133.
- WATSON, R. W. G., ROTSTEIN, O. D., NATHENS, A. B., PARODO, J., MARSHALL, J. C.: Neutrophil apoptosis is modulated by endothelial transmigration and adhesion molecule engagement. *Journal of Immunology*, 1997. 158: 945-953.
- WHYTE, M. K. B., MEAGHER, L. C., MACDERMOT, J., HASLETT, C.: Impairment of function in aging neutrophils is associated with apoptosis. *J Immunol*, 1993. 150: 5124-5134.

Adresa

Ing. Tereza Langrová, Doc. MVDr. Zbyšek Sládek, Ph.D., Ústav morfologie, fyziologie a genetiky zvířat, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika, MVDr. Dušan Ryšánek, CSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství v Brně, Hudcova 70, 621 32 Brno, Česká republika