

VYUŽITÍ METOD DETEKCE APOPTÓZY A NEKRÓZY NEUTROFILNÍCH GRANULOCYTŮ KRVE SKOTU *IN VITRO*

P. Sláma, Z. Sládek, D. Ryšánek

Došlo: 20. července 2006

Abstract

SLÁMA, P., SLÁDEK, Z., RYŠÁNEK, D.: *Application of methods for detection of apoptosis and necrosis of bovine blood neutrophil granulocytes in vitro*. Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun., 2006, LIV, No. 5, pp. 107–116

The study was an *in vitro* analysis of bovine blood neutrophil apoptosis and necrosis based on the detection of their morphological and biochemical features. The experiment was carried out in six clinically healthy Holstein x Bohemian Red Pied crossbred virgin heifers aged 16 to 18 months. The fresh and *in vitro* cultivated blood were analysed by light and electron microscopy and flow cytometry. In fresh blood, non apoptotic or necrotic neutrophils were found by light microscopy. On the other hand, 3.34% apoptotic and 0.32% necrotic neutrophils were detected by flow cytometry. After four hours of incubation, 3.53% apoptotic and 1.37% necrotic neutrophils were found by light microscopy. In the same conditions, there were assessed 17.54% apoptotic and 0.58% necrotic neutrophils by flow cytometry. Correlation coefficient between light microscopy and flow cytometry in portion of apoptotic neutrophils was 0.625 ($P < 0.05$) and correlation coefficient between light microscopy and flow cytometry in portion of necrotic neutrophils was 0.983 ($P < 0.05$). There was found out that these detection methods (light microscopy and flow cytometry) are right combination for detection of apoptotic and necrotic bovine blood neutrophils.

apoptosis, necrosis, neutrophil, phosphatidylserine, flow cytometry

Krev je jednou ze základních biologických tekutin, která sehraává významnou úlohu v obraných pochodech organismu, neboť je distribuována v systému krevních cév prakticky do všech částí těla živého organismu. Jedním z druhu krevních elementů, které plní obranné funkce, jsou neutrofilní granulocyty (neutrofily). Ty představují významnou komponentu nespecifického obranného systému organismu vůči vníkájícím mikroorganismům. Především při akutních zánětech dochází k jejich migraci z krve do tkání, kde uplatňují svoji fagocytární funkci. Poté umírají apoptózou (programovaná buněčná smrt), při patologických procesech nekrózou (smrt nefyziologická, neprogramovaná) (PAAPE et al., 2003).

Genetické, biochemické a morfologické vlastnosti apoptotických buněk se staly podkladem pro zavede-

ní a použití celé řady detekčních technik. Vzhledem k rychlosti a dynamice buněčných reakcí je nutno provádět detekci apoptózy buněk nikoliv pouze jednou, ale nejlépe dvěma a více metodami současně. Důvodem je neexistence univerzálního markeru apoptózy. Komplikujícím faktorem je rovněž skutečnost, že každé stadium apoptózy buněk reflektuje rozdílný marker. Prakticky to znamená, že například během časného stadia apoptózy dochází k translokaci fosfatidylserinu (PS) (VERMES et al., 1995; HOMBURG et al., 1995), což není možné vizualizovat běžnou světelnou mikroskopií. Naopak stadium karyopyknózy je pomocí mikroskopických technik patrné i při nižším zvětšení. Z výše uvedených důvodů se stává současné použití dvou technik detekce tzv. zlatým pravidlem analýzy apoptózy buněk (DARZYNKIEWICZ et al.,

1992; VERMES et al., 2000). Dodržení tohoto pravidla tak zaručuje objektivnější posouzení incidence tohoto procesu.

Technika světelné mikroskopie vychází z detekce morfologických znaků apoptózy a nekrózy. Byla první metodou, pomocí níž byla popsána apoptóza buněk (hepatocytů jater potkana). Stala se tak základní metodou detekce apoptózy buněk (KERR et al., 1972). Pro detekci apoptózy granulocytů byly mikroskopické techniky použity později (SAVILL et al., 1989).

Apoptotické buňky rozpoznatelné ve světelném mikroskopu se projevují následujícími změnami: zmenšením buněk, nahloučením a kondenzací chromatinu, fragmentací jádra (ARENDS et al., 1990; DELVECCHIO et al., 1993), vakuolizací cytoplazmy, bobtnáním jádra a prasknutím jaderných a plazmatických membrán (HODGE et al., 1999).

Nekróza buněk je morfologicky snadno odlišitelná od apoptózy, ve světelném mikroskopu je patrný charakteristický otok a rozpad nekrotických buněk (GRANVILLE et al., 1998; REED, 2000). V elektronovém mikroskopu se nekróza buněk projevuje shlukováním chromatinu, otoky organel a v pozdějších stádiích nekrózy rozpadem membrány a dezintegrací buněk (KERR et al., 1972; GORMAN et al., 1996).

Průtoková cytometrie (FCM) „těžší“ především z biochemických znaků apoptózy a nekrózy buněk. Avšak má stejně jako mikroskopie své limity a omezení, zejména co se týká analýzy apoptózy u neutrofilů krve. Metody FCM využívají markerů apoptózy a nekrózy, které reflektují biochemické změny situované v jádře, v cytoplazmě nebo na cytoplazmatické membráně. Metodologie FCM pro detekci apoptózy založená na propustnosti plazmy a jaderných membrán pro barviva navazující se na DNA (SASAKI et al., 1987; SAVILL et al., 1993; CARBONARI et al., 1994) vyžaduje izolaci těchto buněk z plné krve. Důvodem je interference kontaminujícími erytrocyty (TELFORD et al., 1994).

PS je membránovým fosfolipidem a byl prokázán na povrchu buněk (zevní straně cytoplazmatické membrány) v časném stadiu apoptózy (VERMES et al., 1995; HOMBURG et al., 1995). Annexin-V je přirozeným ligandem PS a pokud je konjugován s FITC (fluorescein isothiocyanate), lze detekovat neutrofilu podléhající časnému stadiu apoptózy (HOMBURG et al., 1995). Tato metoda se jeví jako velmi výhodná pro analýzu krevních elementů při zpracování většího množství vzorků. Nevýhodou je však detekce zejména časného stadia apoptózy, jež není morfologicky odlišitelná od fyziologicky normální buňky. Tedy touto metodou detekované apoptotické neutrofilu tvoří celou populaci apoptotických buněk. Při použití konvenčních hematologických metod s použitím krevních nátěrů a jejich analýzy zejména techni-

kami světelné mikroskopie jsou tyto časně apoptotické neutrofilu „neviditelné“.

Při hodnocení vstupní populace buněk z plné krve je v první řadě nutné zhodnotit „normalitu“ morfologie buněk. Rutinním nástrojem pro zhodnocení morfologie buněk je světelná mikroskopie, která je zároveň dostačující metodou pro hodnocení apoptózy a nekrózy buněk. Vzhledem k tomu, že neexistuje univerzální marker pro hodnocení apoptózy, je nutno tuto detekční techniku kombinovat s použitím jiné automatizované metody, např. FCM. Pokud je nám známo, u bovinní krve byla provedena detekce apoptózy a nekrózy neutrofilů buď světelnou mikroskopií (YANG et al., 1998) nebo průtokovou cytometrií (VAN OOSTVELDT et al., 1999). Tato skutečnost vede k vyslovení hypotézy, zda je možné tyto metody použít současně pro stanovení životnosti krevních neutrofilů.

Cílem práce se proto stalo posoudit, zda metody založené na odlišném markeru buněčné smrti lze současně použít k detekci apoptózy a nekrózy neutrofilů, zejména s ohledem na zachycení jak časného, tak pozdního stadia apoptózy.

MATERIÁL A METODIKA

Pokusná zvířata a experimentální uspořádání

Experimenty byly provedeny na šesti klinicky zdravých nezapuštěných jalovicích, kříženkách holštýnského a českého strakatého plemene. Jejich stáří bylo 16 až 18 měsíců.

Čerstvá krev a krev čtyři hodiny inkubovaná v termostatu při 37 °C a 5 % atmosféry CO₂ byla zbavena erytrocytů pomocí lytického činidla FACS Lysing Solution. Detekce apoptózy a nekrózy neutrofilů byla provedena světelnou mikroskopií, transmisí elektronovou mikroskopií, rastrovací elektronovou mikroskopií a průtokovou cytometrií.

Odběr krve

Krev (100 ml) byla získána odběrem z *vena jugularis* do sterilní nádoby NTS s antikoagulans – Heparin (Léčiva a.s., Dolní Měcholupy, Česká republika), 1000 m.j. v 10 ml pufrovaného fyziologického roztoku (PBS) (Phosphate buffered saline – Sigma, Saint Louis, Missouri, USA).

Inkubace a izolace neutrofilů

Důvodem inkubace je fakt, že vzorky čerstvé krve obsahují nízké zastoupení apoptotických a nekrotických neutrofilů (VAN OOSTVELDT et al., 1999). Proto byla v této práci provedena *in vitro* inkubace pro zvýšení podílů apoptotických a nekrotických buněk dle SAVILL et al. (1989).

Nesrážlivá krev byla napipetována do mikrotitrační destičky (Corning Ultra Low Attachment Products,

Life Sciences, Acton, MA, USA). Vzorky krve byly inkubovány čtyři hodiny v termostatu při 37 °C a 5% atmosféry CO₂. Izolace neutrofilů byla provedena před analýzou vzorků pomocí činidla FACS Lysing Solution technikou dle HODGE et al. (1999). K vzorku krve (500 µl) byly přidány 2 ml FACS Lysing Solution (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, California, USA), vzorek byl promíchán a odstředěn 5 minut při 500 g. Po odstředění následovalo slítí supernatantu, přidání 2 ml PBS, opětovné odstředění 5 minut při 500 g, odstranění supernatantu a resuspendace v 500 µl RPMI-1640. Poté byly izolované neutrofilly detekovány níže uvedenými technikami.

Světelná mikroskopie

Pro detekci apoptózy a nekrózy metodou světelné mikroskopie byly zhotoveny krevní nátěry. Nátěry z buněčné suspenze v RPMI byly provedeny nanesením 10 µl suspenze buněk a 10 µl autologního bovinního séra. Nátěry byly obarveny po zaschnutí při laboratorní teplotě panoptickým barvením podle Pappenheima. Obarvené nátěry byly analyzovány světelným mikroskopem s použitím imerzního oleje (Olympus BH2, Olympus Optical Co., Ltd, Tokyo, Japan) počítáním přinejmenším 200 neutrofilů na jednom skle dle SLÁDKA a RYŠÁNKY (2000b).

Transmisní elektronová mikroskopie (TEM)

Vzorky pro TEM byly připraveny dle SLÁDKA a RYŠÁNKY (1999). Buňky byly fixovány dvě hodiny v 3% glutaraldehydu zředěném v kakodylátovém pufru a třikrát promyty po 30 minutách v 0,1 M kakodylátovém pufru. Poté byly přes noc fixovány pomocí 0,02 M OsO₄ rozpuštěném v kakodylátovém pufru, dehydrovány v alkoholu a prosyceny acetone a Durcupanem I. Následující den byly buňky prosyceny, stabilizovány a polymerizovány Durcupanem II. Ultratenké řezy (90 nm, Ultramicrotome LKB, Bromma, Stockholm, Sweden) byly přemístěny na mřížku pokrytou formvarovou blánou (Marivac Ltd, Halifax, Canada). Pro kontrastní barvení byl použit 2% uranyl acetát a Reynoldsův roztok. Ultratenké řezy byly analyzovány pomocí TEM (Morgagni 268, FEI Europe B. V., Eindhoven, Netherlands). K tomuto účelu byl použit software AnalySIS (Soft Imaging System, GmbH, Münster, Germany).

Rastrovací elektronová mikroskopie (SEM)

Zpracování vzorků pro SEM bylo provedeno metodou dle SLÁDKA a RYŠÁNKY (2001). Buňky byly fixovány dvě hodiny v 3% glutaraldehydu zředěném v kakodylátovém pufru a následně třikrát promyty

po 30 minutách v 0,1 M kakodylátovém pufru. Poté byly dehydratovány ve vzestupné řadě alkoholu (50–100 %) a zpracovány technikou kritického bodu. Po připevnění na hliníkové destičky a po pokovení zlatem byly pozorovány v rastrovacím elektornovém mikroskopu TESLA BS 300 (Tesla a. s., Brno, Česká republika) při pracovním napětí 23 kV. Elektronomogramy byly digitalizovány a vyhodnoceny jako elektronogramy z TEM (viz výše).

Průtoková cytometrie (FCM)

Apoptotické a nekrotické neutrofilly byly ve FCM detekovány po předchozím simultánním barvení Annexinem-V fluorescein isothiocyanate (FITC) a propidium jodidem (PI), jak popsali VERMES et al. (1995). Annexin-V-FLUOS Staining Kit (Boehringer Mannheim, GmbH, Mannheim, Germany) byl použit v souladu s instrukcemi výrobce (postup simultánního barvení): 500 µl inkubačního pufru (10 mM Hepes/NaOH, pH 7,4; 140 mM NaCl; 2,5 mM CaCl₂) bylo smícháno s 10 µl PI a 10 µl FITC-Annexinu-V. Do 500 µl suspenze buněk bylo přidáno 100 µl takto připraveného pracovního roztoku Annexinu-V a PI. Po 15 minutách inkubace při laboratorní teplotě bylo analyzováno v FCM 20000 buněk. K analýze byl použit FCM (FACS Calibur apparatus, Beckton Dickinson, Mountain View, California, USA) napojený na řídicí počítač Macintosh Quadra 650 (Apple Computer Inc., USA) vybavený softwarem CELLQuestTM (Beckton Dickinson, Mountain View, California, USA), kterým byly pořízeny tzv. dot ploty („tečkové grafy“), které byly následně kvantitativně a kvalitativně vyhodnoceny za použití softwaru WinMDI 2.8 (TROTTER, 2000).

Nejprve byly identifikovány jednotlivé typy buněk a poté byl diskriminován pouze region neutrofilů metodou dle VAN OOSTVELDT et al. (1999). Po softwarové změně os FSC a SSC na osy FL1 a FL3 byla detekována pozitivita na Annexin-V a PI. Na těchto dot plotech tak byly pomocí dvojbarevného značení vizualizovány živé, apoptotické a nekrotické neutrofilly generované diskriminací populace těchto buněk podle positivity na Annexin-V a podle positivity na PI metodou dle VERMES et al. (1995).

Statistické vyhodnocení

Podíl apoptotických a nekrotických neutrofilů krve byl prezentován aritmetickým průměrem a směrodatnou odchylkou. Byl stanoven korelační koeficient v podílu apoptotických a nekrotických neutrofilů mezi detekčními metodami (světelnou mikroskopií a FCM). Data byla zpracována programem STAT Plus software (MATOUŠKOVÁ et al., 1992).

VÝSLEDKY

Světelná mikroskopie

Pomocí světelného mikroskopu byly na nátěrech z čerstvé krve diferencovány následující typy leukocytů: neutrofilů, lymfocytů, eosinofilů a monocytů. Neutrofilů z těchto leukocytů zaujímaly $33,04 \pm 1,73$ %, lymfocytů $59,62 \pm 3,37$ %, eosinofilů $3,16 \pm 0,87$ %, monocytů $2,87 \pm 0,58$ %. Po čtyřhodinové inkubaci bylo zastoupení jednotlivých typů buněk následující: neutrofilů $34,17 \pm 2,23$ %, lymfocytů $58,27 \pm 4,35$ %, eosinofilů $3,38 \pm 0,66$ %, monocytů $3,26 \pm 1,02$ %. Krev inkubovaná čtyři hodiny *in vitro* vykazovala v populaci neutrofilů převážně morfologicky normální buňky (obr. 1).

V čerstvé krvi nebyly zjištěny pomocí světelného mikroskopu apoptotické ani nekrotické neutrofilů. Po čtyřech hodinách inkubace se v krvi v menší míře vyskytovaly neutrofilů se strukturou buněk podléhající zániku, tedy apoptotické a nekrotické neutrofilů. Apoptotické neutrofilů se nacházely ve třech strukturálně odlišných stádiích. Jednalo se především o karyopyknózu, méně pak zeiozu a stadium apoptotických tělísek. Karyopyknóza byla charakteristická redukcí velikosti jádra, kondenzací chromatinu a cytoplazmy (obr. 2).

Zeioza se projevila zkroucením cytoplazmatické membrány, buňky získaly bublinkový vzhled. Apoptotické neutrofilů se v terminálním stadiu rozpadaly na jaderné fragmenty různé velikosti obklopené cytoplazmatickou membránou – apoptotická tělíska (obr. 3).

Nekrotické neutrofilů vykazovaly nejprve známky kondenzace chromatinu a poté bobtnání jádra, které se postupně zvětšovalo. Dále docházelo k bobtnání cytoplazmy a buňka tak získala sférický tvar. Při karyolýze došlo k ztrátě celistvosti jaderné membrány a vylití obsahu jádra do cytoplazmy. V konečném stadiu nekrózy u buněk praskla cytoplazmatická membrána a došlo k vylití obsahu buňky (cytolýza).

Podle výše uvedené strukturální charakteristiky bylo po čtyřech hodinách inkubace zaznamenáno $3,53 \pm 0,95$ % apoptotických a $1,37 \pm 1,09$ % nekrotických neutrofilů.

Elektronová mikroskopie

Prostřednictvím metod TEM a SEM byla rovněž detekována apoptóza a nekróza neutrofilů, které byly ultrastrukturálně odlišné od morfologicky normálních neutrofilů. Vzhledem k nízkému počtu hodnocených neutrofilů (40) však nebylo možné spolehlivě určit diferenciální počet leukocytů a poměr apoptotických a nekrotických neutrofilů.

Transmisní elektronová mikroskopie (TEM)

Čerstvá krev a vzorky krve po čtyřech hodinách inkubace obsahovaly převahu neutrofilů s normální ultrastrukturou. Tyto buňky vykazovaly následující ultrastrukturu: na povrchu neutrofilů okrouhlého až oválného tvaru se nacházela kuželovitá pseudopodia. Jádra neutrofilů byla segmentovaná zpravidla do 2–4 segmentů. V cytoplazmě se nacházely granule (obr. 4).

Ojedinele byly nalezeny apoptotické neutrofilů. Následuje výčet ultrastrukturální charakteristiky apoptotického neutrofilu: Během počátečních stádií apoptózy došlo ke ztrátě pseudopodií, cytoplazmatická membrána neutrofilů tak získala hladký povrch (obr. 5). Dále docházelo k morfologickým změnám patrným na jádře buněk. Jednalo se o redukci velikosti jádra buňky a změnu struktury chromatinu. Chromatin kondenzoval do prstenčitých nebo pŕlměsíčitých útvarů, které se nejčastěji nacházely na periferii jádra. Ojedinele se vyskytovaly neutrofilů s vakuolou, jak je vidět na obr. 6.

Rastrovací elektronová mikroskopie (SEM)

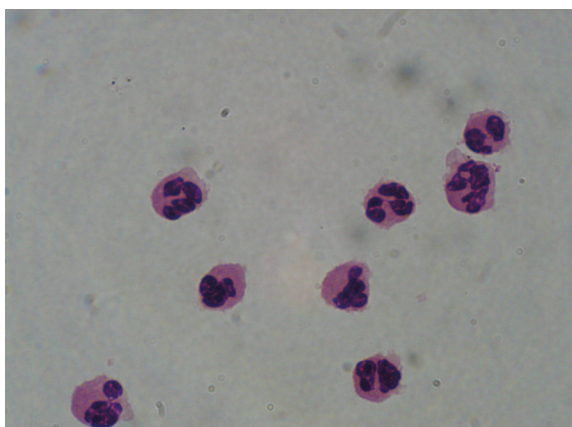
Povrchová ultrastruktura převážně většiny neutrofilů z čerstvé krve a kontrolních vzorků nevykazovala známky patologických změn. Neutrofilů měly sférický nebo mírně ovoidní tvar, na jejich povrchu se nacházela krátká pseudopodia (obr. 7).

Prvním znakem apoptózy neutrofilů byla ztráta pseudopodií, která se vyskytovala v populaci neutrofilů. Buňky měly sférický tvar s hladkým povrchem (obr. 8).

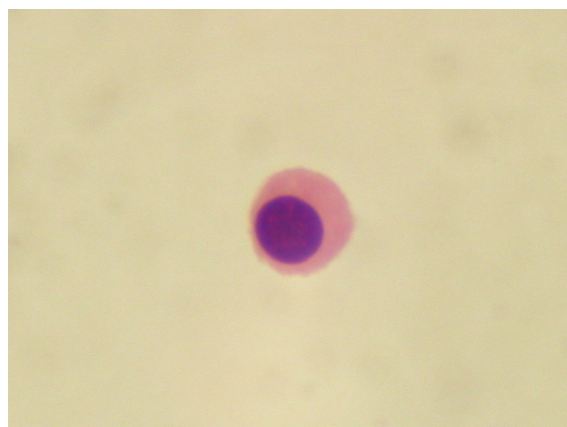
Průtoková cytometrie (FCM)

V čerstvé krvi bylo zjištěno $32,87 \pm 4,81$ % neutrofilů. Krev po čtyřech hodinách inkubace obsahovala $30,91 \pm 5,56$ % neutrofilů (obr. 9). U čerstvé krve bylo pomocí FCM zaznamenáno $3,34 \pm 1,79$ % apoptotických a $0,32 \pm 0,14$ % nekrotických neutrofilů. Vzorky krve čtyři hodiny inkubované při teplotě 37°C vykazovaly po čtyřech hodinách $17,54 \pm 3,32$ % apoptotických a $0,58 \pm 0,16$ % nekrotických neutrofilů (obr. 10).

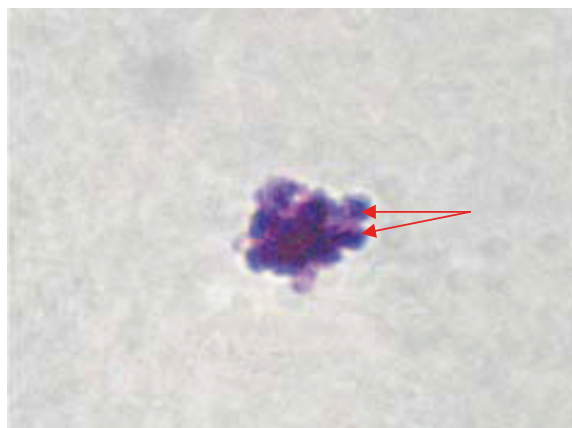
Porovnáním metod detekce (světelné mikroskopie a FCM) s ohledem na podíl apoptotických a nekrotických neutrofilů bylo dosaženo následujících výsledků: Byla zjištěna střední korelační závislost v podílu apoptotických neutrofilů mezi uvedenými detekčními technikami (korelační koeficient $0,625$, $P < 0,05$). V podílu nekrotických neutrofilů byla zjištěna silná korelační závislost (korelační koeficient $0,983$, $P < 0,05$).



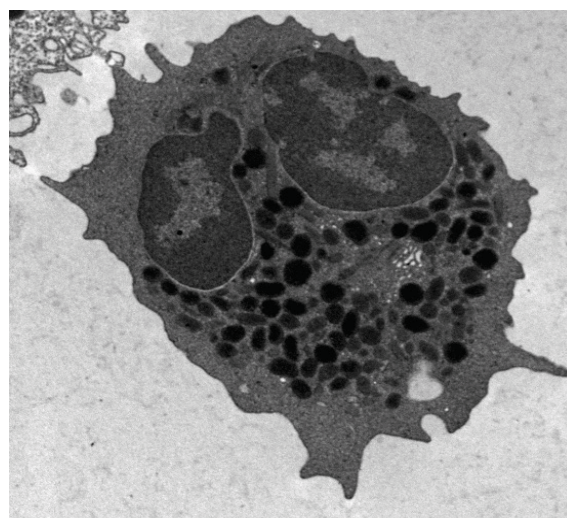
1: Morfologicky normální bovinní neutrofil krve. Panoptické barvení dle Pappenheima. Světelná mikroskopie, primární zvětšení 1000 \times .



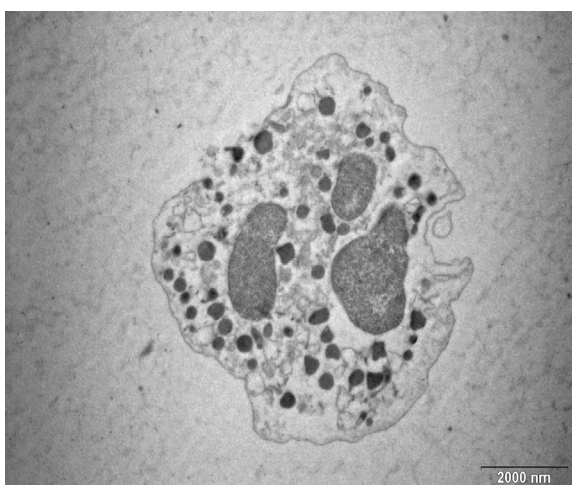
2: Apoptotický neutrofil ve stadiu karyopyknózy. Panoptické barvení dle Pappenheima. Světelná mikroskopie, primární zvětšení 1000 \times .



3: Apoptotický neutrofil ve stadiu zeiózy s tvořícími se apoptotickými tělísky (šipky). Panoptické barvení dle Pappenheima. Světelná mikroskopie, primární zvětšení 1000 \times .



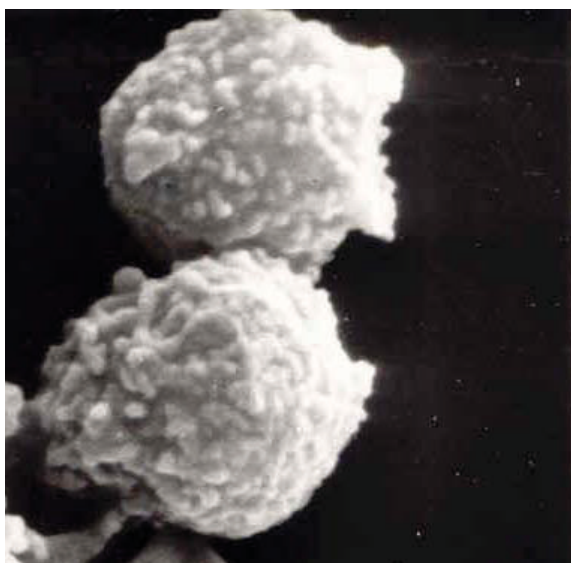
4: Morfologicky normální bovinní neutrofil. Jsou patrná pseudopodia na povrchu buňky, dva jaderné segmenty a cytoplazmatické granule. Transmisní elektronová mikroskopie, primární zvětšení 10000 \times .



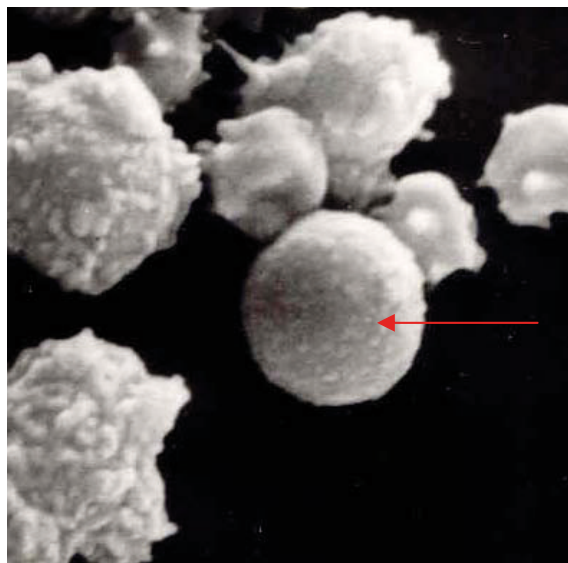
5: Počátek apoptózy neutrofilu, u kterého se projevuje ztráta pseudopodií. Buňka má hladký povrch cytoplazmatické membrány. Transmisní elektronová mikroskopie, primární zvětšení 10000 \times .



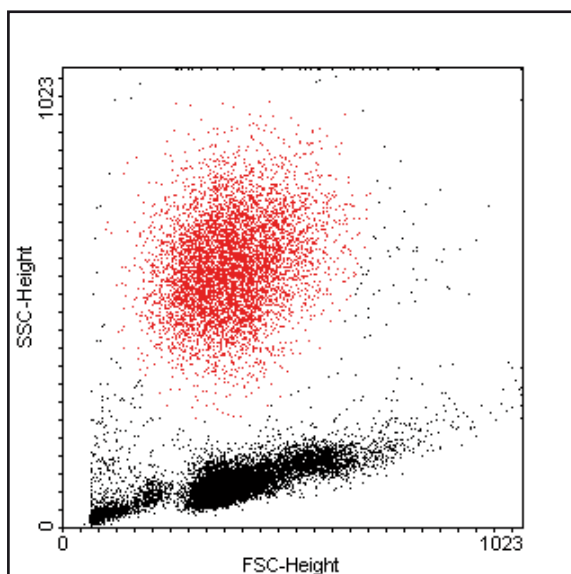
6: Počátek apoptózy neutrofilu, u kterého se objevuje malá vakuola (šipka). Buňka zde má opět hladký povrch cytoplazmatické membrány. Transmisní elektronová mikroskopie, primární zvětšení 10000 \times .



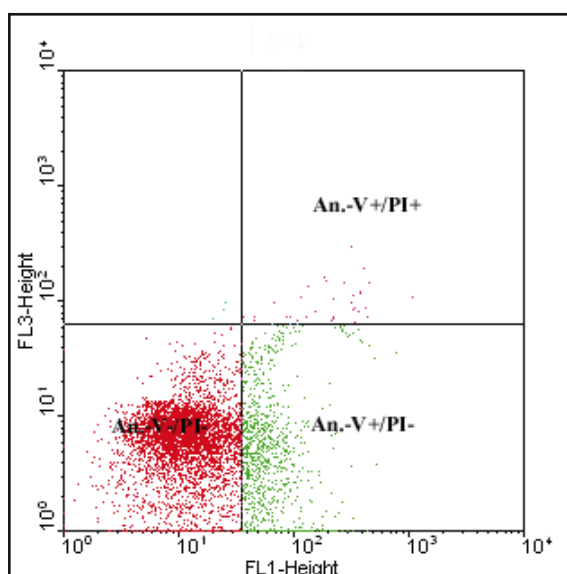
7: Morfologicky normální bovinní neutrofily. Na obrázku jsou zřetelně patrná pseudopodia. Rastrovací elektronová mikroskopie, primární zvětšení 4000 \times .



8: Neutrofil se ztrátou pseudopodií (šipka). Rastrovací elektronová mikroskopie, primární zvětšení 4000 \times .



9: Dot plot demonstruje region neutrofilů (červeně) krve skotu po čtyřech hodinách inkubace *in vitro*. Průtoková cytometrie.



10: Na obrázku je dot plot s parametry FL1 a FL3 se subregiony neutrofilů rozmístěnými do tří kvadrantů: normální neutrofily (An.-V⁻/PI⁻) – levý spodní kvadrant, apoptotické neutrofily (An.-V⁺/PI⁻) – pravý spodní a nekrotické (An.-V⁺/PI⁺) – pravý horní kvadrant. Jedná se o dot plot získaný po analýze vzorku krve inkubované čtyři hodiny. Průtoková cytometrie – obarvení Annexinem-V a PI.

DISKUSE

Existuje velké množství technik detekce apoptózy a nekrózy buněk, které lze použít rovněž při sledování těchto forem buněčné smrti u krevních elementů. Standardní technikou pro detekci snížené životnos-

ti buněk krve je mikroskopie (HODGE et al., 1999). V současné době se však tato metoda stává metodou doplňkovou. Je nahrazována metodami do značné míry automatizovanými, které jsou tedy použitelné pro rychlou kvantifikaci buněk. Jedná se především

o metody FCM. Mikroskopie pak v kombinaci s touto metodou sehrává roli spíše kvalitativní analýzy. Avšak to nic nemění na faktu, že právě světelná mikroskopie představuje rutinní nástroj snad každého hematologa. Navíc, pomocí světelné mikroskopie byla poprvé zaznamenána apoptóza buněk (KERR et al., 1972). Kombinace mikroskopických technik s metodami detekce apoptózy pomocí FCM je široce používaná (SGONC a GRUBER, 1998; STADELMANN a LASSMANN, 2000).

Morfologické změny při apoptóze neutrofilů, patrné již při použití techniky světené mikroskopie, zahrnovaly především kondenzaci chromatinu jádra, ztrátu segmentace jaderných laloků, sraštění a sféricitu buněk (karyopyknóza). Méně pak tvorbu membránových vezikulí (zeióza) a formování apoptotických tělísek. Zde popsané strukturální změny byly již dříve zaznamenány u bovinních neutrofilů v podmínkách *in vitro* (STEVENS a CZUPRYNSKI, 1996; SLÁDEK a RYŠÁNEK, 2000a; SLÁDEK a RYŠÁNEK, 2000b; CUDD et al., 2001; SLÁDEK a RYŠÁNEK, 2001; SLÁDEK et al., 2001; LANGROVÁ et al., 2005; SLÁDEK a RYŠÁNEK, 2005; SLÁDEK et al., 2005).

Ultrastrukturální charakteristiky apoptotických neutrofilů, hodnocené v TEM, plně korespondovaly se strukturálními charakteristikami apoptotických neutrofilů ve světelné mikroskopii. Při karyopyknóze měly neutrofilové sférický tvar, došlo ke slití jaderných segmentů. Stadium zeiózy a apoptotických tělísek se vyskytovalo ojediněle. Při zeióze došlo k vytvoření povrchových prohlubní a záhybů připomínajících bublinky. Následně pak docházelo k odškrcování apoptotických tělísek. SEM názorně ukázala ztrátu pseudopodií apoptotických neutrofilů. Shodné ultrastrukturální změny apoptotických bovinních neutrofilů zaznamenali: SLÁDEK a RYŠÁNEK (2000a), SLÁDEK a RYŠÁNEK (2000b), CUDD et al. (2001), SLÁDEK a RYŠÁNEK (2001), SLÁDEK et al. (2001), LANGROVÁ et al. (2005), SLÁDEK a RYŠÁNEK (2005), SLÁDEK et al. (2005). Nutno však podotknout, že použití metod elektronové mikroskopie je zatíženo nutností pořízení velkého množství elektronogramů pro posouzení dostatečného počtu buněk. Proto lze tyto metody použít v omezeném rozsahu, jako metody doplňkové.

Srovnáme-li však výše zmíněné morfologické projevy apoptózy neutrofilů skotu, člověka (SAVILL et al., 1989; PAYNE et al., 1994), prasete (MATALOVÁ et al., 2000; MATALOVÁ et al., 2003), laboratorních zvířat (YAMAMOTO et al., 1993; COX et al., 1995; HUSSAIN et al., 1998; ISHII et al., 1998; MESZAROS et al., 1999), kozy (VACHIERY et al., 1999) a psa (OGUMA et al., 2000), nenajdeme mezi nimi žádný zásadní rozdíl. Apoptóza bovinních neutrofilů tak vykazuje morfologicky shodnou chronologii jako

u většiny savců. To nasvědčuje tomu, že apoptóza je vysoce konzervativní proces. Bylo však zjištěno, že existují rozdíly v morfologii apoptotických neutrofilů v podmínkách *in vitro* a *in vivo*. Jak uvádějí PAYNE et al. (1994), apoptóza neutrofilů *in vitro* probíhá ve stejných stadiích jako *in vivo*, ale při kultivacích humánních neutrofilů v podmínkách *in vitro* dochází ke vzniku megavakuol postupným splynutím cisteren endoplazmatického retikula apoptotické buňky. Nepřítomnost megavakuol u apoptotických neutrofilů *in vivo* si vysvětlují tou skutečností, že jsou apoptotické buňky velmi rychle rozpoznány a fagocytovány makrofágy, a proto k tvorbě megavakuol nestačí dojít. V experimentech naší práce však nebyly při kultivacích *in vitro* megavakuoly v cytoplazmě apoptotických neutrofilů detekovány. Jen ojediněle byly zaznamenány malé vakuoly v cytoplazmě apoptotických neutrofilů. Výskyt megavakuol u apoptotických neutrofilů je tak pravděpodobně spojen s delší dobou inkubace, čemuž odpovídá také obrazový materiál uvedený v publikaci PAYNE et al. (1994).

Při nekróze neutrofilů došlo ke strukturálním změnám jako jsou: desegmentace a bobtnání jádra, bobtnání cytoplazmy, ztráta pseudopodií, sféricita buněk, karyolýza a cytolýza. Tyto změny charakteristické pro nekrózu neutrofilů detekovali rovněž NICKERSON et al. (1985), PAAPE et al. (1991), SLÁDEK a RYŠÁNEK (1999).

Výše shrnutá morfologická charakteristika plně dostačuje k identifikaci apoptotických a nekrotických neutrofilů, i přesto je však doporučováno k detekci apoptózy používat současně alespoň dvě metody založené na průkazu odlišných markerů apoptózy (DARZYNKIEWICZ et al., 1992; VERMES et al., 2000). Důvodem je fakt, že v současné době neexistuje univerzální marker apoptózy buněk. Je-li tedy jedna z metod morfologická (mikroskopie), pak je vhodné dále použít metodu založenou na detekci jiného než morfologického markeru apoptózy buněk (STADELMANN a LASSMANN, 2000). Jako velmi vhodná metoda detekce apoptózy buněk heterogenních populací se jeví FCM s použitím simultánního barvení translokovaného PS (VERMES et al., 1995). Předností této metody je možnost analýzy buněk v suspenzi, rychlá analýza vysokého počtu buněk, možnost rychlého a automatického vyhodnocení pomocí softwarové podpory, možnost značení několika povrchových determinant, existence mnoha dostupných a ověřených komerčních kitů a relativně snadná příprava vzorků a značení buněk (vztaženo na počet buněk na jednotku času).

Výsledky získané analýzou ve FCM při obarvení na Annexin-V a PI vykazovaly výrazně vyšší zastoupení apoptotických neutrofilů, než je tomu u výsledků získaných světelnou mikroskopii. Tento fakt má však své opodstatnění. Dynamika procesu apoptózy

zahrnuje časnou fázi, charakteristickou translokací PS z vnitřní na vnější stranu cytoplazmatické membrány (VERMES et al., 1995). Světelnou mikroskopií jsou naopak zaznamenány morfologické změny, ke kterým dochází následně po uvedených biochemických změnách receptorů na povrchu buněk (MARTIN et al., 1995). Z toho vyplývá, že při analýze apoptózy buněk je nutno používat dvě metody detekce s afinitou jak na časné, tak na pozdní stadium apoptózy.

Při analýze buněk ve FCM byla suspenze buněk barvena Annexinem-V pro detekci apoptózy v kombinaci s PI pro detekci nekrózy buněk. Nekrotické buňky v tomto případě vykazují pozitivitu jak na PI, tak na Annexin-V. Při detekci apoptózy a nekrózy bovinních neutrofilů krve použili tuto metodu VAN OOST-

VELDT et al. (1999). Použití této metody detekce smrti buněk se jeví jako výhodné zejména s ohledem na rychlost a počet vyhodnocených vzorků a krevních elementů.

Mezi světelnou mikroskopií a FCM byla zjištěna střední korelační závislost v podílu apoptotických neutrofilů (korelační koeficient 0,625, $P < 0,05$). V podílu nekrotických neutrofilů byla zjištěna silná korelační závislost (korelační koeficient 0,983, $P < 0,05$).

Výsledky experimentů naznačují, že zvolené metody jsou vhodnou kombinací morfologické (mikroskopie) a biochemické (FCM) analýzy apoptózy a nekrózy bovinních neutrofilů krve. Současně je tak analyzováno jak časné (FCM), tak pozdní (mikroskopie) stadium apoptózy.

SOUHRN

Studie byla *in vitro* analýzou apoptózy a nekrózy bovinních neutrofilů krve, která byla založena na detekci jejich morfologických a biochemických znaků. Experiment byl proveden na šesti klinicky zdravých jalovicích kříženkách holštýnského a českého strakatého plemene ve věku 16–18 měsíců. Čerstvá krev a krev kultivovaná *in vitro* byly analyzovány světelnou a elektronovou mikroskopií a průtokovou cytometrií. Pomocí světelné mikroskopie nebyly v čerstvé krvi zjištěny apoptotické ani nekrotické neutrofilie. Naproti tomu bylo pomocí průtokové cytometrie zaznamenáno 3,34 % apoptotických a 0,32 % nekrotických neutrofilů. Po čtyřech hodinách inkubace bylo v krvi pomocí světelného mikroskopu zjištěno 3,53 % apoptotických a 1,37 % nekrotických neutrofilů. Za stejných podmínek vykazovaly vzorky krve v průtokovém cytometru 17,54 % apoptotických a 0,58 % nekrotických neutrofilů. Korelační koeficient v podílu apoptotických neutrofilů mezi světelnou mikroskopií a průtokovou cytometrií byl 0,625 ($P < 0,05$), kdežto korelační koeficient v podílu nekrotických neutrofilů mezi světelnou mikroskopií a průtokovou cytometrií byl 0,983 ($P < 0,05$). Bylo zjištěno, že tyto detekční techniky (světelná mikroskopie a průtoková cytometrie) jsou vhodnou kombinací detekce apoptózy a nekrózy bovinních neutrofilů krve.

apoptóza, nekróza, neutrofil, fosfatidylserin, průtoková cytometrie

Tato práce vznikla za podpory výzkumného projektu GA ČR č. 524/03/1531.

LITERATURA

- ARENDS, M. J., MORRIS, R. G., WYLLIE, A. H.: Apoptosis: the role of endonuclease. *Am. J. Pathol.*, 1990. 136: 593–608.
- CARBONARI, M., CIBATI, M., CHERCHI, M., SBARIGIA, D., PESCE, A. M., DELL'ANNA, L., MODICA, A., FIORILLI, M.: Detection and characterisation of apoptotic peripheral blood lymphocytes in human immunodeficiency virus infection and cancer chemotherapy by a novel flow immunocytometric method. *Blood*, 1994. 83: 1268–1277.
- COX, G., CROSSLEY, J., XING, Z.: Macrophage engulfment of apoptotic neutrophils contributes to the resolution of acute pulmonary inflammation *in vivo*. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 1995. 12: 232–237.
- CUDD, L. A., OWNBY, C. L., CLARKE, C. R., SUN, Y., CLINKENBEARD, K. D.: Effects of Mannheimia haemolytica leukotoxin on apoptosis and oncosis of bovine neutrophils. *Am. J. Vet. Res.*, 2001. 62: 136–141.
- DARZYNKIEWICZ, Z., BRUNO, S., DELBINO, G., GORCZYCA, W., HOTZ, M. A., LASSOTA, P., TRAGANOS, F.: Features of apoptotic cells as measured by flow cytometry. *Cytometry*, 1992. 13: 795–808.
- DELVECCHIO, M. T., LEONCINI, L., BUERKI, K., KRAFT, R., MEGHA, T., BARBINI, P., TOSI, P., COTTIER, T.: Diffuse centrocytic and/or centroblastic malignant non-Hodgkin's lymphomas: comparison of mitotic and pyknotic (apoptotic) indices. *Int. J. Cancer*, 1993. 124: 116–121.
- GORMAN, A., MCCARTHY, J., FINUCANE, D.,

- REVILLE, W., COTTER, T.: Morphological assessment of apoptosis. In: COTTER, T. G., MARTIN, S. J. (eds.) *Techniques in apoptosis. A user's guide*. London: Portland Press Ltd, 1996. 1–20.
- GRANVILLE, D. J., CARTHY, C. M., HUNT, D. W., McManus, B. M.: Apoptosis: molecular aspects of cell death and disease. *Lab. Invest.*, 1998. 78: 893–913.
- HODGE, G. L., FLOWER, R., HAN, P.: Optimal storage conditions for preserving granulocyte viability as monitored by Annexin V binding in whole blood. *J. Immunol. Methods*, 1999. 225: 27–38.
- HOMBURG, C., DEHAAS, M., VONDEMBORNE, A., VERHOAVEN, A., REUTINGSBERGER, C., ROOS, D.: Human neutrophils lose their surface FcγR11 and acquire Annexin V binding sites during apoptosis *in vitro*. *Blood*, 1995. 85: 532–540.
- HUSSAIN, N., WU, F., ZHU, L., THRALL, R. S., KRESCH, M. J.: Neutrophil apoptosis during the development and resolution of oleic acid-induced acute lung injury in the rat. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 1998. 19: 867–874.
- ISHII, Y., HASHIMOTO, K., NOMURA, A., SAKAMOTO, T., UCHIDA, Y., OHTSUKA, M., HASEGAWA, S., SAGAI, M.: Elimination of neutrophils by apoptosis during the resolution of acute pulmonary inflammation in rats. *Lung*, 1998. 176: 89–98.
- KERR, J. F. R., WYLLIE, A. H., CURRIE, A. R.: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, 1972. 68: 239–257.
- LANGROVÁ, T., SLÁDEK, Z., RYŠÁNEK, D.: Vliv bakterií *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus uberis* na morfologické projevy apoptózy neutrofilních granulocytů mléčné žlázy skotu *in vitro*. *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun.*, 2005. 53: 61–74.
- 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. *J. Exp. Med.*, 1995. 182: 1545–1556.
- MATALOVÁ, E., ŠPANOVÁ, A., KOVÁŘŮ, F., HEROLDOVÁ, M.: Apoptosis activation in pig leukocytes after phagocytosis of *Salmonella typhimurium*. *Acta Vet. Brno*, 2000. 69: 11–15.
- MATALOVÁ, E., ŠPANOVÁ, A., KOVÁŘŮ, F.: Apoptotic DNA alterations in pig leukocytes after phagocytosis of bacteria are linked to maturation of the immune system. *Physiol. Res.*, 2003. 52: 235–242.
- MATOUŠKOVÁ, O., CHALUPA, J., CÍGLER, M., HRUŠKA, K.: *STAT Plus – Manual*. Brno: Veterinary Research Institute, 1992. 168 s.
- MESZAROS, A. J., REICHNER, J. S., ALBINA, J. E.: Macrophage phagocytosis of wound neutrophils. *J. Leukoc. Biol.*, 1999. 65: 35–42.
- NICKERSON, S. C., PAAPE, M. J., DULIN, A. M.: Effect of antibiotics and vehicles on bovine mammary polymorphonuclear leukocyte morphologic features, viability, and phagocytic activity *in vitro*. *Am. J. Vet. Res.*, 1985. 46: 2259–2265.
- OGUMA, K., KANO, R., HASEGAWA, A.: *In vitro* study of neutrophil apoptosis in dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2000. 76: 157–162.
- PAAPE, M. J., MILLER, R. H., ZIV, G.: Pharmacologic enhancement or suppression of phagocytosis by bovine neutrophils. *Am. J. Vet. Res.*, 1991. 52: 363–366.
- PAAPE, M. J., BANNERMAN, D. D., ZHAO, X., LEE, J.-W.: The bovine neutrophils: Structure and function in blood and milk. *Vet. Res.*, 2003. 34: 597–627.
- 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. *Microsc. Res. Techniq.*, 1994. 28: 327–344.
- REED, J. C.: Mechanisms of apoptosis. *Am. J. Pathol.*, 2000. 157: 1415–1430.
- SASAKI, D. T., DUMAS, D. T., ENGLEMAN, E. G.: Discrimination of viable and nonviable cells using propidium iodide in two colour immunofluorescence. *Cytometry*, 1987. 8: 413–420.
- SAVILL, J. S., WYLLIE, 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. *J. Clin. Invest.*, 1989. 83: 865–875.
- SAVILL, J. S., FADOK, V., HENSON, P. M., HASLETT, C.: Phagocytic recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol. Today*, 1993. 14: 131–139.
- SGONC, R., GRUBER, J.: Apoptosis detection: an overview. *Exp. Gerontol.*, 1998. 33: 525–533.
- SLÁDEK, Z., RYŠÁNEK, D.: Ultrastructure of phagocytes from mammary glands of non-pregnant heifers. *Anat. Histol. Embryol.*, 1999. 28: 291–298.
- SLÁDEK, Z., RYŠÁNEK, D.: Apoptosis of polymorphonuclear leukocytes of the juvenile bovine mammary gland during induced influx. *Vet. Res.*, 2000a. 31: 553–563.
- SLÁDEK, Z., RYŠÁNEK, D.: Morphology of apoptosis of polymorphonuclear leukocytes isolated from juvenile bovine mammary glands. *Vet. Med. Czech*, 2000b. 45: 71–81.
- SLÁDEK, Z., RYŠÁNEK, D.: Apoptosis of neu-

- trophilic granulocytes of bovine virgin mammary gland in scanning electron microscopy. *Vet. Med. Czech*, 2001. 46: 185–189.
- SLÁDEK, Z., RYŠÁNEK, D., FALDYNA, M.: Light microscopic and flow cytometric detection of apoptosis and necrosis of neutrophils in the mammary gland of the virgin heifer. *Acta Vet. Brno*, 2001. 70: 149–155.
- SLÁDEK, Z., RYŠÁNEK, D.: Tissue pool neutrophils of the bovine mammary gland: ultrastructural features during in vitro senescence. *Anat. Histol. Embryol.*, 2005. 34: 159–66.
- SLÁDEK, Z., RYŠÁNEK, D., FALDYNA, M.: Effect of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus uberis* on apoptosis of bovine mammary gland neutrophils *in vitro*. *Vet. Med. Czech*, 2005. 50: 11–23.
- STADELMANN, C., LASSMANN, H.: Detection of apoptosis in tissue sections. *Cell Tissue Res.*, 2000. 301: 19–31.
- STEVENS, P. K., CZUPRYNSKI, C. J.: *Pasteurella haemolytica* leukotoxin induces bovine leukocytes to undergo morphologic changes consistent with apoptosis in vitro. *Infect. Immun.*, 1996. 64: 2687–2694.
- TELFORD, W. G., KING, L. E., FRAKER, P. J.: Rapid quantitation of apoptosis in pure and heterogeneous cell populations using flow cytometry. *J. Immunol. Methods*, 1994. 172: 1–16.
- TROTTER, J.: WinMDI Version 2.8. <http://facs.scripps.edu/>, 2000.
- VACHIERY, N., TOTTE, P., BALCER, V., MARTINEZ, D., BENSAID, A.: Effect of isolation techniques, in vitro culture and IFN gamma treatment on the constitutive expression of MHC Class I and Class II molecules on goat neutrophils. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1999. 70: 19–32.
- 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. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1999. 70: 125–133.
- VERMES, I., HAANEN, C., STEFFENS-NAKKEN, H., REUTELINGSPERGER, C.: A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods*, 1995. 184: 39–51.
- VERMES, I., HAANEN, C., REUTELINGSPERGER, C.: Flow cytometry of apoptotic cell death. *J. Immunol. Methods*, 2000. 243: 167–190.
- YAMAMOTO, C., YOSHIDA, S., TANIGUCHI, H., QIN, M. H., MIYAMOTO, H., MIZUGUCHI, Y.: Lipopolysaccharide and granulocyte colony-stimulating factor delay neutrophil apoptosis and ingestion by guinea pig macrophages. *Infect. Immun.*, 1993. 61: 1972–1979.
- YANG, Y. F., SYLTE, M. J., CZUPRYNSKI, C. J.: Apoptosis: a possible tactic of *Haemophilus somnus* for evasion of killing by bovine neutrophils? *Mikrob. Pathog.*, 1998. 24: 51–359.

Adresa

Ing. Petr Sláma, 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