

# **BOVINE BLOOD NEUTROPHILS: INFLUENCE OF ISOLATION TECHNIQUES TO SURVIVAL**

## **KREVNÍ NEUTROFILY SKOTU: VLIV IZOLAČNÍCH TECHNIK NA ŽIVOTNOST**

### **Sláma P.**

Ústav morfologie, fyziologie a veterinářství, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika.

E-mail: xslama@node.mendelu.cz

### **ABSTRACT**

We evaluate effect of isolation techniques on survival of blood neutrophils from clinically healthy Holstein x Bohemian Red Pied crossbred heifers. In this study we used two methods of blood neutrophil isolation: hypotonic lysis of erythrocytes method and adherence of neutrophils method. Survival of isolated neutrophils was evaluated by detection of apoptosis and necrosis of this cells. The higher proportion of apoptotic neutrophils was obtained using adherence of neutrophil method where results was recorded by light microscopy.

**Keywords:** neutrophil, apoptosis, necrosis, bovine blood, isolation techniques, phosphatidylserine, Annexin V, propidium iodide, flow cytometry

### **ABSTRAKT**

U krve klinicky zdravých jalovic, kříženek holštýnského a českého strakatého plemene, byl zjišťován vliv izolačních technik na životnost krevních neutrofilů. Pro tuto studii byly použity dvě metody izolace krevních neutrofilů: izolace neutrofilů s hypotonickou lýzou erytrocytů a izolace neutrofilů s využitím adherence buněk. Životnost izolovaných neutrofilů byla zjišťována detekcí apoptózy a nekrózy těchto buněk. Podle výsledků získaných světelným mikroskopem byla životnost neutrofilů nejvíce snížena při metodě využívající schopnosti adherence, neboť u této metody izolace bylo zjištěno nejvyšší zastoupení apoptotických buněk.

**Klíčová slova:** neutrofil, apoptóza, nekróza, bovinní krev, izolační techniky, fosfatidylserin, Annexin V, propidium jodid, průtoková cytometrie

### **ÚVOD**

Význam studia krevních buněk je v současné době mimořádný nejen v humánní medicíně, ale rovněž v medicíně veterinární [1]. V drtivé většině případů se ke studiu krevních elementů používají metody in vitro. K tomuto účelu je nezbytné disponovat kvalitními technikami izolace, které co nejméně ovlivňují biologické funkce izolovaných buněk. Je zcela pochopitelné, že nejvýznamější a pro studium in vitro nejvíce negativní je ovlivnění samotné životnosti buněk, tj. vliv izolačních technik na oba možné typy smrti buněk: apoptózu (fyziologickou smrt)

a nekrózu (patologickou smrt). Vzhledem k tomu, že výše uvedené problematice bylo doposud v oblasti veterinární hematologie věnováno velmi málo pozornosti, stala se tato problematika předmětem mé disertační práce.

## **CÍL A METODIKA**

Cílem práce je zjistit, do jaké míry izolační techniky ovlivňují životnost neutrofilů krve skotu, tzn. jak vysoce indukují apoptózu a nekrózu. Dílčím cílem je stanovit vliv izolačních technik na procentuální zastoupení leukocytů při různých technikách izolace neutrofilů – tedy stanovit puritu – výtěžnost metod.

Krev byla získána odběrem z vena jugularis od klinicky zdravých jalovic, kříženek holštýnského a českého strakatého plemene. V experimentech byl sledován vliv dvou izolačních technik, a to izolace neutrofilů hypotonickou lýzou erytrocytů a izolace s využitím adherence leukocytů. Heparinizovaná krev byla při izolaci metodou hypotonické lýzy erytrocytů podrobena hypotonickému prostředí na dobu 40 sekund. Po tuto dobu bylo 50 ml heparinizované krve mícháno se 100 ml redestilované vody. Pro vyrovnání isotonického tlaku bylo po uplynutí dané doby přidáno 50 ml 2,7 % roztoku NaCl. Po této proceduře následovalo desetiminutové odstředění v chlazené odstředivce při využití rozdílných gravitačních sil (g): metoda šetrná (200 g), metoda hrubá (600 g). Po odstředění následovalo slítí supernatantu a přidání 50 ml PBS (pufrovaný fyziologický roztok). Procedura se poté opakovala od lýzy erytrocytů až po odstředění. Následně se u obou metod provedla resuspendace v PBS, rozplnění do zkumavek a opakované odstředění při 200 g [2]. Po adjustaci v hemocytometru ( $10^5$ /ml buněk pro světelnou mikroskopii a  $10^6$ /ml buněk pro průtokovou cytometrii) se pro světelnou mikroskopii nanoslo 0,5 ml suspenze na dvě podložní skla pro každou z metod. Následovalo uložení těchto skel v termostatu (ve vlhké komůrce na 45 minut při teplotě 37 °C a 5 % atmosféry CO<sub>2</sub>) a následně panoptické barvení. Pro průtokovou cytometrii se ve dvou ependorfkách obarvila suspenze (0,5 ml do každé) Annexinem V a propidium jodidem (100 µl na jednu ependorfku) [3].

Při metodě využívající adhezenci leukocytů byla heparinizovaná krev navrstvena na dvě skla (1 ml na jedno sklo) a po 45 minutách v termostatu (za podmínek shodných s první metodou) bylo provedeno panoptické barvení. V počátečních experimentech byla při této metodě využívána corning plotna pro adhezenci buněk, tato metoda se však neosvědčila (slabá výtěžnost neutrofilů), takže bylo pokračováno jen s adhezencí na podložní skla.

Průtoková cytometrie (FACS, Becton Dickinson, CA, USA) byla použita jen ve třech experimentech, ve kterých byla touto metodou také analyzována plná krev. Tato krev prošla procedurou trojího odstředění při 500 g a následným obarvením annexinem V a propidium jodidem (viz výše).

## VÝSLEDKY

Životnost izolovaných neutrofilů byla posuzována podle míry výskytu apoptózy a nekrózy. Životnost neutrofilů byla podle výsledků dosažených při hodnocení světelným mikroskopem nejvíce snížena při metodě využívající schopnosti adherence těchto krevních buněk (Tab. 1). Mezi oběma metodami nebyl statisticky významný rozdíl v přítomnosti nekrotických neutrofilů, výskyt apoptotických neutrofilů byl však výrazně vyšší při metodě z plné krve využívající již výše zmíněnou adhezenci neutrofilů (Tab. 2). Metoda hypotonické lýzy erytrocytů byla prováděna ve dvou variantách s různou velikostí gravitační síly při odstředění následujícím po lýze erytrocytů. Metoda využívající větší gravitační síly při odstředění nevykazovala vyšší poškození buněk (Tab. 1), výtěžnost neutrofilů však byla při této metodě vyšší. Největší zastoupení neutrofilů vykazovala metoda využívající adherence. Vyšší podíl lymfocytů byl zaznamenán u metody hypotonické lýzy (Tab. 1). Průtoková cytometrie prokázala, že metody založené na lýze erytrocytů a následném odstředění (jemná a hrubá metoda) rezultují ve zvýšeném zastoupení propidium jodid pozitivních buněk (nekrotických), zatímco u metody s plnou krví byla zaznamenána nekróza ojediněle.

Tab. 1: Souhrnné výsledky pokusů získané světelným mikroskopem:

		<b>Pokus č. 1</b>	<b>Pokus č. 2</b>	<b>Pokus č. 3</b>	<b>Pokus č. 4</b>	<b>Pokus č. 5</b>	<b>Pokus č. 6</b>	<b>Pokus č. 7</b>	<b>Pokus č. 8</b>	<b>Průměr pokusů</b>
<b>Neutrofilý živé</b>	<b>A</b>	89,00	89,50	85,50	82,25	77,75	89,50	90,75	86,75	<b>86,38</b>
	<b>J</b>	92,25	89,50	92,25	82,75	75,75	82,25	-	79,00	<b>84,82</b>
	<b>H</b>	91,50	91,50	92,00	83,25	77,25	84,50	-	75,00	<b>85,00</b>
<b>Neutrofilý apoptotické</b>	<b>A</b>	9,00	3,25	2,00	10,25	10,00	1,50	6,25	2,50	<b>5,59</b>
	<b>J</b>	1,50	2,25	2,00	2,75	6,00	6,50	-	2,00	<b>3,29</b>
	<b>H</b>	1,00	1,25	1,00	4,50	7,25	2,25	-	1,50	<b>2,68</b>
<b>Neutrofilý nekrotické</b>	<b>A</b>	0,25	1,75	5,00	1,00	3,50	2,75	1,75	1,50	<b>2,19</b>
	<b>J</b>	2,50	1,50	2,00	1,75	2,75	2,50	-	5,00	<b>2,57</b>
	<b>H</b>	2,25	1,00	1,75	1,25	2,00	5,00	-	6,25	<b>2,79</b>
<b>Neutrofilý celkem</b>	<b>A</b>	98,25	94,50	92,50	93,50	91,25	93,75	98,75	90,75	<b>94,16</b>
	<b>J</b>	96,25	93,25	96,25	87,25	84,50	91,25	-	86,00	<b>90,68</b>
	<b>H</b>	94,75	93,75	94,75	89,00	86,50	91,75	-	82,75	<b>90,46</b>
<b>Monocyty</b>	<b>A</b>	0,50	0,75	0,00	1,50	0,00	0,50	0,50	0,00	<b>0,48</b>
	<b>J</b>	0,00	1,00	0,25	0,50	0,00	0,25	-	1,00	<b>0,43</b>
	<b>H</b>	0,25	0,75	0,25	1,00	1,00	1,25	-	0,25	<b>0,68</b>
<b>Lymfocyty</b>	<b>A</b>	0,00	0,00	0,75	2,50	3,25	0,00	0,75	0,00	<b>0,91</b>
	<b>J</b>	0,50	1,25	0,50	5,75	6,75	5,00	-	2,75	<b>3,21</b>
	<b>H</b>	0,75	3,75	2,00	3,50	5,25	1,50	-	5,25	<b>3,14</b>
<b>Eosinofily</b>	<b>A</b>	1,25	4,75	6,75	2,50	5,50	5,75	0,00	9,25	<b>4,47</b>
	<b>J</b>	3,25	4,50	3,00	6,50	8,75	3,50	-	10,25	<b>5,68</b>
	<b>H</b>	4,25	1,75	3,00	6,50	7,25	5,50	-	11,75	<b>5,71</b>

A – izolace s využitím adherence; J – jemná metoda (hypotonická lýza erytrocytů); H – hrubá metoda (hypotonická lýza erytrocytů)

Tab. 2: Statistické údaje výsledků pokusů získaných světelným mikroskopem:

		<b>Průměr</b>	<b>Rozptyl</b>	<b>Směrodatná odchylka</b>	<b>Variační koeficient</b>
<b>Neutrofilý živé</b>	<b>A</b>	86,38	16,37	4,05	4,68
	<b>J</b>	84,82	37,29	6,11	7,20
	<b>H</b>	85,00	42,41	6,51	7,66
<b>Neutrofilý apoptotické</b>	<b>A</b>	5,59	12,28	3,50	62,68
	<b>J</b>	3,29	3,62	1,90	57,85
	<b>H</b>	2,68	4,77	2,18	81,52
<b>Neutrofilý nekrotické</b>	<b>A</b>	2,19	1,99	1,41	64,34
	<b>J</b>	2,57	1,16	1,08	41,96
	<b>H</b>	2,79	3,47	1,86	66,73
<b>Neutrofilý celkem</b>	<b>A</b>	94,16	6,96	2,64	2,80
	<b>J</b>	90,68	19,86	4,46	4,91
	<b>H</b>	90,46	18,85	4,34	4,80

## DISKUSE

Na první pohled se zdá, že dochází k rozporu mezi výsledky získanými při hodnocení populace buněk průtokovou cytometrií a výsledky získanými světelnou mikroskopií. Konkrétně se jedná o podíl nekrotických neutrofilů. Výsledky z průtokové cytometrie vykazují podstatně vyšší zastoupení nekrotických neutrofilů, než je tomu u výsledků získaných světelnou mikroskopií. Tento zdánlivý rozpor má však své opodstatnění. Hodnocení buněk průtokovou cytometrií je založené na detekci jejich povrchových receptorů umístěných na povrchu buněk, tedy na cytoplazmatické membráně. Konkrétně se jedná o průkaz translokovaného fosfatidylserinu na povrchu analyzovaných buněk pomocí značeného annexinu V a propidium jodidu. Buňky predisponované pro nekrózu nebo apoptózu mění design svého povrchu, tj. mění se jejich povrchové receptory. Tyto buňky mohou být detekovány průtokovou cytometrií, ale světelným mikroskopem nikoliv. Světelnou mikroskopií jsou naopak zaznamenány morfologické změny, ke kterým dochází následně po uvedených biochemických změnách receptorů buněk. Uvedenou hypotézu by měly potvrdit další experimenty disertační práce, které budou hodnotit proces stárnutí buněk (aging). V těchto experimentech bude kladen důraz na hodnocení životnosti buněk během dlouhodobé kultivace in vitro a rovněž vliv fyzikálních faktorů.

Dosavadní výsledky naznačují, že průtoková cytometrie je vhodnou metodou pro hodnocení buněčných populací kultivovaných krevních neutrofilů. Z tohoto důvodu je plánováno o její plné využití v budoucích experimentech.

## ZÁVĚR

Životnost neutrofilů byla podle dosažených výsledků nejvíce snížena při metodě využívající schopnosti adherence těchto krevních buněk. Tato metoda izolace rezultovala v indukci apoptózy mechanismem senescence – stárnutí – tj. spontánní apoptózou.

## POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Doubek, J. et al. *Veterinární hematologie* 1. vyd. Brno: Noviko a. s., 2003. 468 s. ISBN 80-86542-02-5.
- [2] Carlson, G. P., Kaneko, J. J. *Isolation of Leukocytes from Bovine Peripheral Blood* Proc. Soc. Biol. Med. 142, 1973: 853 – 856.
- [3] Tait, J. F., Smith, C., Wood, B. L. *Measurement of Phosphatidylserine Exposure in Leukocytes and Platelets by Whole-Blood Flow Cytometry with Annexin V* Blood Cells, Molecules, and Diseases 25 (17), 1999: 271 – 278.