

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zdravotně sociální fakulta

Cytochemická vyšetření aktivity nukleolů po podání genisteinu
na modelovém objektu

Bakalářská práce

Vypracoval: Veronika Picmonová

Vedoucí práce: Prof. RNDr. Josef Berger, CSc.

Datum: 14. 5. 2008

Abstract:

This thesis deals with exploration of the effect of genistein on proteosynthetic activity of nucleoli by observing changes in their morphology.

The effect of genistein on the function of nucleoli was observed in hemocytes of the experimental animal *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae). 4 types of hemocytes were found in the hemolymph of *S. littoralis* (Boisd.): granulocytes, prohemocytes, plasmatocytes and spherulocytes. The effect of genistein on individual types and concentration of hemocytes is not clear.

Genistein was applied in doses of 0,135 mg and 0,54 mg per larva, and subsequently changes in morphology, number and size of nucleoli were examined upon 8 and 24 hours. Furthermore, changes in morphology of the hemocytes were examined, as well as their concentration using toluidine blue staining, silver staining, Pappenheim panoptic staining and using the Türk's solution. For the purpose of changes assessment, the material was processed using an optical microscope and the computer software Nis Element AR 2.30.

In the course of observation, changes in the number of nucleoli were found upon application of genistein. The number of compact nucleoli and micronucleoli increased. On the contrary, the number of ring-shaped nucleoli decreased.

The area of nucleoli increased upon application of lower dosage of genistein (0,135 mg); however, upon action of the higher dose (0,54 mg), it decreased, on the contrary. Nucleolar index values remained without rather significant changes.

In the biomodel used, genistein evoked changes which can be viewed as immune responses from the viewpoint of hematotoxicology.

Poděkování:

Ráda bych poděkovala svému školiteli Prof. RNDr. Josefu Bergerovi, CSc. za odborné vedení mé práce po stránce praktické i teoretické a za poskytnutí cenných rad. Také bych na tomto místě ráda poděkovala Doc. RNDr. Ivanu Gelbičovi, CSc. za poskytnutí experimentálních zvířat pro mou práci a cenné rady.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Cytochemická vyšetření aktivity nukleolů po podání genisteinu na modelovém objektu vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě/v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zdravotně sociální fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne

.....

Podpis studenta

Obsah:

ÚVOD	7
1. SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY	8
1.1. MORFOLOGIE A AKTIVITA JADÉRKA.....	8
1.2. GENISTEIN (C ₁₅ H ₁₀ O ₅).....	11
1.3. HEMOCYTY	13
2. CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZY:	15
3. METODY	16
3.1. APLIKACE GENISTEINU.....	16
3.2. ODBĚR HEMOLYMFY	16
3.3. BARVENÍ TOLUIDINOVOU MODŘÍ DLE SMETANY	17
3.4. BARVENÍ STŘÍBREM (AGNOR) PODLE HOWELA A BLACKA.....	17
3.5. PAPPENHEIMOVO PANOPTICKÉ BARVENÍ.....	18
3.6. BÜRKEROVA KOMŮRKA	18
3.7. STATISTICKÉ HODNOCENÍ VÝSLEDKŮ	19
4. VÝSLEDKY:	20
4.1. BARVENÍ TOLUIDINOVOU MODŘÍ	20
4.1.1. <i>Kompaktní jadérka</i>	20
4.1.2. <i>Prstěncitá jadérka</i>	21
4.1.3. <i>Mikrojadérka</i>	22
4.1.4. <i>Nukleolární index</i>	24
4.2. BARVENÍ STŘÍBREM	24
4.2.1. <i>Plocha jadérek</i>	24
4.2.2. <i>Nukleolární index</i>	25
4.3. PAPPENHEIMOVO PANOPTICKÉ BARVENÍ.....	26
4.3.1. <i>Malé granulocyty</i>	26
4.3.2. <i>Velké granulocyty</i>	27
4.3.3. <i>Granulocyty</i>	28
4.3.4. <i>Malé prohemocyty</i>	29
4.3.5. <i>Velké prohemocyty</i>	30
4.3.6. <i>Prohemocyty</i>	30
4.3.7. <i>Sferulocyty</i>	32

4.3.8.	<i>Plasmatocyty.....</i>	32
4.3.9.	<i>Celkový počet hemocytů v litru hemolymfy.....</i>	34
5.	DISKUSE:.....	35
6.	ZÁVĚR:	40
7.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY:	41
8.	KLÍČOVÁ SLOVA:	44

Úvod

Xenobiotika jsou chemické látky, které mají na organismy různé vlivy, proto je důležité znát mechanismy jejich účinků.

Tyto látky je možné testovat na bezobratlých živočiších. Jsou dva důvody pro testování bezpečnosti sloučenin na bezobratlých: za prvé ohodnocení xenobiotik, která by mohla v přírodě tato zvířata zabít (pesticidy, aj.) a za druhé použití bezobratlých jako biomodelů před tím, než budou tyto přírodní nebo syntetické chemikálie preklinicky testovány na savcích, nebo lidských dobrovolnících. Přestože se zdají být savci, zejména krysy, myši, psi, králíci a opice nezbytnými pro preklinické testy, ekonomické, etické, právní a politické aspekty představují určitá omezení pro jejich použití (Berger, 2000).

Hmyz může pomoci se získáváním informací, které mohou být později využity při testování na obratlovcích (Berger et al., 2003).

1. Současný stav problematiky

1.1. Morfologie a aktivita jadérka

V roce 1774 bylo jadérko (nucleolus) poprvé objeveno Fontanou ve světelném mikroskopu (Bush a Smetana, 1970) v úhořích buňkách (Smetana, 2000). Název nucleolus byl zaveden Valentinem (1836). Další poznatky byly získány díky pokroku vědy během 19. století. Nejprve byla objevena struktura jadérka později jeho funkce. Někteří cytologové začali se souhrnem funkcí jadérek jako znaku pro buněčnou aktivitu s následujícím závěrem: buňky s basofilním jádrem jsou charakteristické buď proliferací nebo produkcí proteinů. Basofilní materiál byl v jadérech identifikován jako RNA. Mnozí autoři dlouho věřili, že jadérka neobsahují DNA. Přítomnost DNA byla potvrzena po použití citlivějších detekčních metod. Morfologie jadérka jako velikost, tvar a barevné vlastnosti byly později využity pro cytologickou diagnostiku rakoviny (Smetana, 2000).

V jadérku probíhá proteosyntéza preribosomální RNA (pre-RNA) za účasti RNA polymerasy I, úpravy pre-tRNA a pre-RNA. Jadérka produkují 80 - 90% buněčné RNA (Bush a Smetana, 1970).

Jadérko je rozsáhlou nápadnou strukturou nacházející se v buňkách eukaryotických jader (Hernandez-Verdun, 2004).

Struktura, velikost a organizace závisí na proteosyntéze ribosomů. Produkce ribosomů přímo souvisí se syntézou proteinů a morfologií jadérka. Závisí také na typu buňky, buněčném dělení a stupni buněčného cyklu. Savčí buňky obsahují malý počet jadérek. (Hernandez-Verdun, 2004). Průměrná velikost jadérek je okolo 1 – 3 μm , plocha 1,4 – 8,7 μm^2 a nukleolární objem je mezi 10 – 25 μm^3 .

Jadérko je jemná struktura zřetelná v elektronovém mikroskopu. V transmisním elektronovém mikroskopu se jadérka zobrazují jako granulární a fibrilární část (Hernandez-Verdun, 2004; Gerbi, 1997). Granula jsou okolo 150 nm silná a tvoří granulární část jadérek. Některé fibrily jsou velmi kontrastní a jsou nazývány „hustá fibrilární část“. Tato fibrilární část obklopuje často fibrilární centrum a je v uzavřeném

kontaktu s granulární částí (Hernandez-Verdun, 2004). Fibrilární část tvoří základní DNA a RNA. DNA je ve formě smyček rozpleteného chromatinu, který nese geny pro ribosomální RNA (rRNA) a RNA složky ribosomů. Fibrilární složky jsou obzvláště husté v oblasti jadérek, kde pokračuje transkripce a je přítomna RNA. Granula rRNA jsou obklopena proteiny importovanými z cytoplasmy do ribosomálních podjednotek. Ribosomální podjednotky jsou exportované přes jaderné póry do cytoplasmy (Bush a Smetana, 1970).

Sada ribosomálních genů v buňce je označována jako oblast nukleolárního organizéru (the nucleolar organizer region = NOR). NOR obsahuje i speciální NOR proteiny (Medina, 2001; Gerbi, 1997). Tyto oblasti byly poprvé popsány McClintockem u kukuřice seté (*Zea mays*) v roce 1934 (Hernandez-Verdun, 2004). Jméno NOR má cytologický původ a bylo vytvořeno na základě následujícího poznatku. Jadérko, které není viditelné během mitózy, se znovu objeví po buněčném dělení v konstantním spojení s jednotlivými oblastmi určitých chromosomů. Jadérko je aktivní v interfázi a rozloženo během profáze. Během telofáze se objeví v místě sekundární konstriktce, neboli v oblasti nukleolárního organizátoru jako pronukleolus (Medina, 2001). Transkripce jadérka a mechanismus transkripce se dědí z mateřské buňky na dceřinou. Během mitózy je potlačen transkripční mechanismus polymerasy I, přestože je sestavena z ribosomálních genů (Hernandez-Verdun, 2004). Počet jadérek je omezen počtem oblastí nukleolárních organizátorů. Celkový počet oblastí nukleolárních organizátorů dosahuje od 0 po 12. (Bush a Smetana, 1970).

Geny rRNA jsou reprezentovány v četných kopiích v celém genomu, a tak jsou důležitým vzorem opakující se DNA, která nese genetickou informaci. Geny rRNA jsou velmi rozmanité. Jejich množství závisí na druhu buňky. Živočišná buňka může obsahovat stovky kopií rRNA genů, rostlinná až tisíce. Četné kopie jsou seskupeny v jednom z mnoha shluků, ve kterých jsou uspořádány za sebou a shluky rRNA genů mohou být založeny na více než jednom chromosomu. Samotné jadérko nemusí být vždy spojené s jedním nukleolárním organizátorem. Například lidský genom obsahuje buď pět nukleolárních organizátorů na haploidní chromosomové sadě nebo deset na diploidních jádrech. Každý nukleolární organizátor je umístěný blízko špičky různých

chromosomů. Ale namísto deseti oddělených jadérek, obsahuje buňka jednotlivá velká jadérka. Ta představují nashromážděné smyčky chromatinu pro deset samostatných chromosomů.

U každého z deseti chromosomů začíná syntéza rRNA, tvoří se desítky drobných viditelných jadérek, která se zvětšují a rychle slučují do jednoho velkého jadérka. Tento jev je charakteristický pro interfázi.

Velikost a tvar jadérka souvisí s úrovní jeho aktivity a mohou být důležitými ukazateli buněčné malignity (Bush a Smetana, 1970; Smetana, 2005). V buňkách probíhá syntéza proteinů vysokou rychlostí tak, aby bylo jadérko schopné vytvořit dostatečné množství ribosomů. Aktivní přírůstek buněčné produkce může být až 10 000 ribosomů za minutu. Jadérka mohou zaujímat 20 - 25% celého objemu jádra. Méně aktivní buňky mají jadérka menší. Hlavní rozdíl je v množství přítomných granulárních komponent.

V jadérku lze barvit ribonukleoproteiny, které jsou velmi značitelné i po vystavení buňky radioaktivním prekurzorům RNA (Bush a Smetana, 1970).

Dle typů dělíme jadérka na kompaktní, prsténčitá a mikrojadérka. Tato klasifikace odráží jejich biosyntetickou aktivitu a proliferační stupeň buňky. První typ je charakterizován aktivní transkripcí RNA, která je snížena u prsténčitých jadérek a inhibována u mikrojadérek (Smetana, 2000; Smetana, 2005).

Kompaktní jadérka mají celistvý vzhled. Fibrilární a granulární struktury mají stálé rozložení. Kompaktní jadérka obsahují RNA. Většina kompaktních jadérek obsahuje nukleonemata. Nukleonemata jsou složená ze struktur obsahujících RNA, které jsou začleněné v amorfní matrix se sníženou elektronovou hustotou. V některých buňkách jsou granula umístěná v periferní části jadérka, zatímco vláknité struktury mohou být pozorovány v nukleonematech umístěných v centrální oblasti. V některých buňkách mohou být vláknité struktury umístěné v periferní nukleonemě. Kompaktní jadérka mohou být i bez nukleonemy, ale buněk s tímto druhem kompaktních jadérek je málo.

Prsténčitá jadérka jsou charakterizována přítomností struktur obsahujících RNA pouze v periferní části jadérka tvořícího skořápku nebo prstenec, která určuje jeho

vzhled. V periferním prstenci obsahujícím ribonukleoproteinové struktury a zbytky nukleonemat se mohou vyskytovat také. Centrální část prsténčitých jadérek obsahuje fibrilární centrum. Ultrastruktura prsténčitých jadérek není u savců ještě dokonale popsána, neboť byla vyšetřována pouze u menšího počtu buněčných druhů. Jednalo se například o některé krevní buňky, spermatocyty nebo oocyty.

Mezi mikrojadérky a ostatními typy jadérek je značný rozdíl. Poprvé popsal přítomnost mikrojadérka Bauer roku 1935 u pakomára *Chironomus tetans* jako „Nebennukleolen“. Tato mikrojadérka popsal ve velkém počtu, ale obvykle byla připojena ke dvěma „makrojadérkům“ (Bush a Smetana, 1970). Transformaci jadérek na mikrojadérka, která mohou vymizet, předchází fyziologické podmínky terminálního stupně buněk krevních linií. Tuto transformaci řídí programovaná buněčná smrt. Ultrastruktura mikrojadérek v terminálním vývojovém stupni krevních buněk je různá, ale je vyjádřena ukončením transkripce rRNA a procesů shromažďování preribosomálních částic. Mikrojadérka dále snižují podíl hustých granulárních částí RNP a perinukleolárního chromatinu. Některá snižují podíl fibrilární části a počet fibrilárních center (Medina, 2001).

Buňky byly klasifikovány do několika tříd dle shody přítomných funkčních dominantních nukleolárních typů. První třída buněk obsahuje velká jadérka s větším či menším množstvím nukleonemat jako dominantními jadérky a mohou také obsahovat další typy jadérek. Druhá třída buněk obsahuje prsténčitá jadérka a může obsahovat mikrojadérka jako přídatný typ. Třetí typ buněk obsahuje pouze mikrojadérka. Mnoho buněk obsahuje pouze jeden typ jadérek. Pokud jsou mikrojadérka přítomna s jinými typy jadérek v jednom jádře, jsou zároveň přítomna satelitní jadérka (Smetana, 2000).

Kvantitativní charakteristika jadérek odráží intenzitu syntézy RNA a proteinů v buňkách a hlavní metabolické stupně buněk (Kavtsevich a Yurko, 2006).

1.2. Genistein ($C_{15}H_{10}O_5$)

Chemický název genisteinu je 4', 5, 7 trihydroxyisoflavon a jeho molekulová hmotnost je 270,2 g/mol. Patří mezi fytoestrogeny (Ulanowska et al.,

2006) a představuje důležitou látku nacházející se především v semenech sóji (*Glycine max*) a dalších bobovitých rostlinách (Fabaceae). V těchto rostlinách je běžným perkurzorem v biosyntéze rostlinných komplementů a důležitou nutriční molekulou. 1g sójového proteinu obsahuje asi 250 mikrogramů genisteinu.

Genistein je fytoestrogen se širokou škálou farmakologických účinků v živočišných buňkách včetně inhibice tyrosinkinázy. Dietní užívání genisteinu má podle epidemiologických studií a studií na živočišných modelech potencionálně zdravotně prospěšné efekty. Mezi ně je zahrnuta chemoprevence rakoviny prsu a prostaty (tzv. tumor-dependentní tumory), kardiovaskulárních onemocnění a postmenopausálních obtíží. Z dalších účinků jsou zmiňovány i imunomodulační či antioxidační (Dixon a Ferreira, 2002). U asijských žen bylo pozorováno snížení výskytu rakoviny prsu oproti ženám žijícím na západě. Tento efekt je připisován vyšší konzumaci sójových produktů (Polívková et al., 2006).

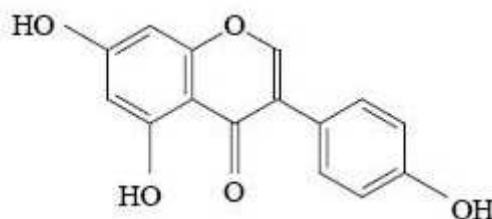
Genistein je schopný modulovat buněčné cykly a zabránit rakovinnému bujení i v dalších orgánových systémech (Salvi et al., 2002; Wei a Rahn, 1996). Inhibuje např. kožní nádorové bujení u myší (Wang et al., 1998). Proto jsou flavonoidy pro již zmíněné antioxidační a fotoprotektivní účinky (Svobodová et al., 2003) v posledních letech používány proti UV záření zejména jako prevence proti rakovině kůže.

U mikroorganismů byl zjištěn bakteriostatický účinek spíše než baktericidní (Ulanowska et al., 2006). U lidských T-lymfocytů je prokázán inhibiční vliv na aktivitu sodíkových kanálů (Tesseyre a Michalak, 2005).

Navzdory četným publikacím o užívání genisteinu v lidské výživě ještě není prokázán jeho celkově pozitivní účinek. Tato otázka zůstává zatím otevřená (Dixon a Ferreira, 2002). Například u myší byl zjištěn mutagenní efekt na erytropoézu a lymfopoézu (Berger et al., 2002) u buněk čínských křečků byly zaznamenány chromosomové aberace jako je delece nebo inverze (Kulling et al., 1999).

V rostlinách je genistein syntetizován z flavonu naringeninů neobvyklou reakcí katalyzovanou cytochromem P450 enzymem izoflavon-synthasou (IFS). IFS geny byly nedávno klonovány pro mnoho rostlinných druhů a produkce genisteinu tím mohla být dosažena i u „neluštěninových“ rostlin díky přístupům využívajících DNA

rekombinace (transgenní rostliny). Tím je umožněna i chemická cesta pro výrobu této látky (Dixon a Ferreira, 2002).



Obr.1. Genistein (Dixon a Ferreira, 2002)

1.3. Hemocyty

Hmyzí hemocyty cirkulující v hemolymfě jsou rozdělovány do několika typů. Jejich primární funkce jsou koagulace, fagocytóza, detoxikace, paměť a distribuce živin (Sajayan et al., 1966). Dále se podílejí na transportu hormonů, při opravě tkáně po zranění a metabolismu některých chemických látek (Gupta, 1978). Znalosti hmyzích hemocytů jsou omezeny studiemi asi 200 čeledí a 100 rodů hmyzu. Hemocyty byly studovány především u řádů Lepidoptera, Hymenoptera, Coleoptera a Diptera. Zde je základní různorodost hemocytů i mezi blízkými příbuznými druhy (Sajayan et al., 1966).

Na základě pozorovaných morfologických znaků bývají hemocyty diferencovány do několika tříd (Gupta, 1978).

V hemolymfě řádu Lepidoptera bylo pozorováno 7 druhů hemocytů. Jsou to prohemocyty, plasmacyty, granulocyty, sferulocyty, adipohemocyty, koagulocyty a oenocytoidy.

U *S. littoralis* (Boisd.) se vyskytují všechny druhy zmíněných hemocytů, ale autoři ve svých pozorováních nejsou jednotní. V posledních letech se méně objevují koagulocyty, oenocytoidy a adipohemocyty. Často se liší i poměr u pozorovaných hemocytů.

Prohemocyty jsou obvykle malé kulaté, oválné nebo eliptické buňky s rozdílnou velikostí (6 - 10 μm široká, 6 - 14 μm dlouhá). Jádro je ve srovnání s jinými typy

hemocytů větší a je umístěno na středu. Cytoplasma je basofilní, při panoptickém barvení jsou podobné lymfocytům obratlovců

Granulocyty jsou kulovité nebo oválné buňky, jejich velikost je rozdílná (4 - 32 μm široké, 10 - 45 μm dlouhé). Jádro je relativně malé kulaté nebo protáhlé a je uloženo ve středu buňky. Cytoplasma je jemně basofilní, charakteristicky granulární. Granula jsou kulovitá, vejčitá, protáhlá nebo neobvykle polygonální.

Plasmatocyty jsou vřetenovité buňky s různou velikostí (3,5 - 5 μm široké, 3,3 - 40 μm dlouhé). Jádro je kulaté nebo protáhlé a je většinou uloženo uprostřed buňky. Je zde zřetelné jadérko. Cytoplasma je bohatá a basofilní.

Sferulocyty jsou buňky oválného tvaru a různé velikosti (5 - 10 μm široké, 9 - 25 μm dlouhé). Jádro je malé, uložené ve středu buňky, ale může být uloženo i excentricky. Jadérko je většinou excentricky uloženo. Cytoplasma je basofilní, hustá a homogenní, jsou v ní patrné sferule o různé velikosti (v průměru od 1,5 do 5 μm). Jsou přítomny okolo jádra. Uvnitř plasmy jsou někdy patrné částičky, které se zdají být fagocytovány.

Názvy jednotlivých druhů hemocytů mají mnoho synonymních názvů. Např. prohemocyty se lze najít i jako proleukocyty či prohemocytoidy, plasmatocyty jako leukocyty nebo lymfocyty, granulocyty jako pyknoleukocyty nebo fagocyty. Mnohdy se synonymní názvy u jednotlivých typů buněk i shodují. Např. název amébocyty lze najít jak u plasmatocytů, tak i u granulocytů (Gupta, 1970).

Gupta se podílel na utřídění druhů hemocytů u hmyzu. Dle něj se mohou granulocyty diferencovat na sferulocyty, koagulocyty a oenocytoidy.

2. Cíle práce a hypotézy:

Cílem této práce je potvrdit nebo vyvrátit hypotézu, že by podání genisteinu mohlo ovlivnit proteosyntetickou aktivitu hemocytů u experimentálního živočicha *Spodoptera littoralis* (Boisd.). K tomuto problému se vztahuje i určení diferenciálního počtu hemocytů, dále určení druhů hemocytů a jejich koncentraci v hemolymfě.

Je zde možnost využití tohoto experimentálního živočicha, jako hematologického biomodelu při podání izoflavonoidu genisteinu nebo doporučení genisteinu k dalšímu testování na obratlovcích.

3. Metody

3.1. Aplikace genisteinu

Genistein byl podáván topikálně ve formě roztoku o koncentraci 200 $\mu\text{mol/l}$ larvám *Spodoptera littoralis* (Boisd.) v šestém (posledním) larválním instaru. Larvy byly rozděleny do čtyř skupin vždy po šesti. První skupina byla využita jako kontrolní (intaktní), nebylo jí aplikováno nic. Druhé skupině byl podán jako placebo 10 μl ethanolu. Tato skupina tvoří pozitivní kontrolu. Třetí skupině bylo podáno 2,5 μl ethanolu s genisteinem, což odpovídá dávce 0,135 mg genisteinu larvě. Poslední skupině bylo podáno 10 μl ethanolu s genisteinem, což odpovídá dávce 0,54 mg genisteinu jedné larvě.

Poté byly larvy ponechány po 8 a 24 h v termostatu při teplotě 25° C při fotoperiodě 16:8 (světlo:tma). Po celou dobu vývoje i během aplikace byly krmeny standardní dietou PREMIX (výrobce Stonefly Industries, Bryan, TX, USA).

Tento živočich byl zvolen, protože hmyz narozdíl od obratlovců při manipulaci nepodléhá stresu a proto u něj nehrozí náhlé výkyvy v krevním obrazu po manipulaci.. Dále práce s hmyzem je ekonomičtější a zatím nevyžaduje souhlas etické komise.

3.2. Odběr hemolymfy

Hemolymfa byla odebrána z larvy *S. littoralis* (Boisd.) (6. larvální instar) vpíchem pod panožku a ihned po odebrání rozetřena na čisté podložní sklíčko. Roztěry byly ponechány na čistém a suchém místě asi 24 hodin. Zaschnuté preparáty pak byly dále zpracovány - viz další postupy.

Hemolymfa byla odebírána vždy šesti larvám z každé experimentální skupiny osm a čtyřadvacet hodin po aplikaci testované látky.

3.3. Barvení toluidinovou modří dle Smetany

Preparáty byly barveny 30 minut pracovním roztokem v poměru 1:50 a poté opláchnuty McIlvainovým pufrům. Pracovní roztok byl vytvořen smísením 0,03 g toluidinové modři Standart a 10 ml McIlvainova pufru o pH 5,0.

McIlvainův pufr byl připraven rozpuštěním 10,5 g kyseliny citrónové a 35,8 g hydrogenfosforečnanu sodného v 500 ml destilované vody. Tyto roztoky byly uchovány samostatně při 4° C. Před použitím byly vytemperovány na pokojovou teplotu.

Struktury obsahující RNA včetně jadérek se barví modře nebo modrofialově. Mohou být obarveny také kyselé mukoproteiny. Barevná reakce látek nebo anatomické umístění těchto látek obvykle rozliší RNA jádra a jadérka (Bush a Smetana, 1970)

Preparáty byly vyhodnoceny do jednoho týdne pomocí světelného mikroskopu při zvětšení objektivu 100x.

Pomocí této metody byla hodnocena kompaktní jadérka (aktivní hemocyt), prstěnicitá jadérka (reverzibilně klidové stadium) a mikrojadérka v padesáti buňkách každého laboratorně sledovaného živočicha. Na základě tohoto morfologického dělení lze určit aktivitu buňky. Byl stanoven nukleolární index, který vyjadřuje počet nukleolů na počet buněk, ve kterých byly nukleoly stanovovány.

3.4. Barvení stříbrem (AgNOR) podle Howela a Blacka

Pro barvení stříbrem bylo nutné připravit dva roztoky. První roztok byl připraven rozpuštěním 2 g želatiny ve 100 ml 1% kyseliny mravenčí. Tento roztok byl uchováván v temnu při pokojové teplotě.

Druhý roztok byl připraven rozpuštěním 2,5 g dusičnanu stříbrného v 5 ml destilované vody. Roztok AgNO₃ je nutné uchovávat v temnu a chladu.

Před aplikací byly oba roztoky smíchány v poměru 1:1, navrstveny na suché krevní roztěry a na 25 minut umístěny do tmy. Barvivo bylo poté slito a preparáty opláchnuty proudem vody a usušeny ve svislé poloze na čistém a suchém místě.

Dobře obarvený preparát má medově hnědožlutou barvu. V preparátu jsou jasně viditelná tmavě zbarvená jádérka. Množství stříbrných granul v jádérku při tomto barvení je odrazem proliferační aktivity buňky (Smetana et al., 1999). Sůl stříbra zachycuje specifické kyselé proteiny, např. RNA polymerasu I, nukleolin, nukleofosmin nebo fibrilin. Tyto specifické proteiny jsou spojeny s oblastmi nukleolárních organizátorů (NORs), jejich biosyntézou a zráním pre-RNA (Smetana, 2000; Kavtsevich and Yurko, 2006). Počet a velikost nukleolárních organizátorů obarvených stříbrem (AgNORs) v krvi je charakteristicky specifický pro jednotlivé druhy (Kavtsevich a Yurko, 2006).

Pomocí této metody byla měřena plocha jáderek a zaznamenán jejich počet pro výpočet nukleolárního indexu. Pro stanovení plochy jáderek byl použit mikroskop Nikon eclipse 50i, zvětšení objektivu 100x a obraz zpracovávající software Nis Elements AR 2.30 (LUCIA). V každém preparátu bylo hodnoceno 50 buněk.

3.5. Pappenheimovo panoptické barvení

Preparáty byly barveny v May-Grümwaldově roztoku po dobu 6 minut, poté byl tento roztok slit a nahrazen na 2 minuty destilovanou vodou. Po uplynutí této doby byla ihned na preparáty nalita směs Giemsy-Romanovského a vody v poměru 1:3 na dobu 30 minut. Poté byly preparáty opláchnuty proudem tekoucí vody a usušeny obvyklým způsobem. Dobře obarvený preparát má fialovou barvu a buňky pozorované v mikroskopu dosahují též různých odstínů fialové barvy. Toto barvení se využívá běžně v humánní hematologii k určení diferenciálního rozpočtu krvinek. V této práci jej bylo využito ke stejným účelům, tedy pro doplňující informace o působení genisteinu na hemocyty. V každém preparátu bylo hodnoceno 100 buněk pomocí světelného mikroskopu při zvětšení objektivu 100x.

3.6. Bürkerova komůrka

Kapky hemolymfy byly odebrány na parafilm. Odtud byla mikropipetou nasáta kapka o objemu 2 μ l a smíchána s 6 μ l Türkova roztoku (poměr 1:3). Türkův roztok

brání koagulaci a umožňuje kontrastnější viditelnost buněk pod mikroskopem při vyhodnocování tím, že je tmavě obarví.

Poté byla směs lymfy a Türkova roztoku kápnuta na komůrku, přikryta krycím sklem a proveden odečet pomocí světelného mikroskopu při zvětšení objektivu 40x.

Zjištěné hodnoty byly přepočteny na koncentraci hemocytů v litru hemolymfy.

3.7. Statistické hodnocení výsledků

V každé skupině bylo použito 6 larev. Hodnoty získané při jednotlivých vyšetřeních byly vyjádřeny jako průměr \pm SEM (směrodatná odchylka průměru).

Pro další hodnocení byl použit oboustranný Mann-Whitneyův U-test na hladině významnosti $2\alpha = 0,05$.

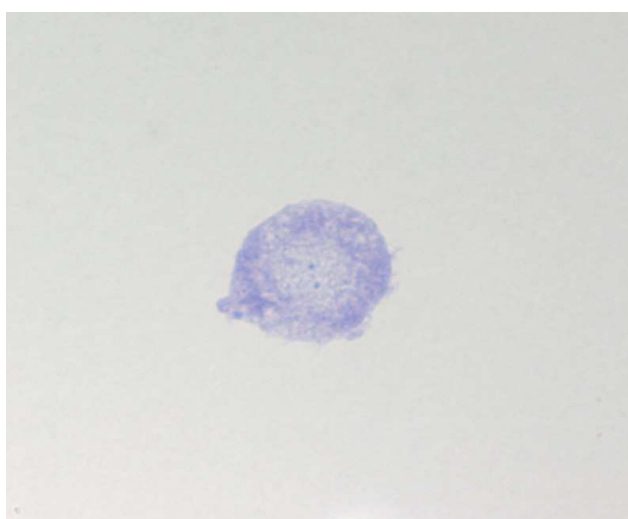
4. Výsledky:

4.1. Barvení toluidinovou modří

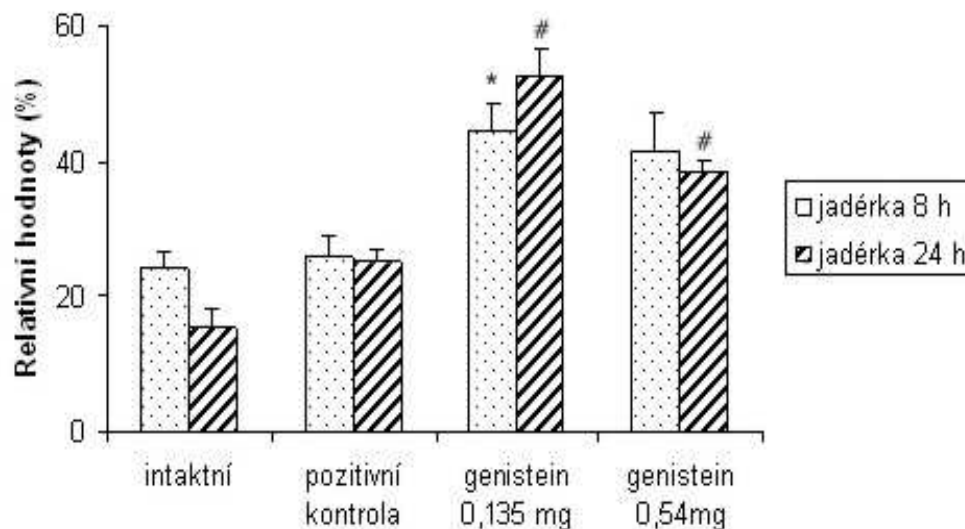
4.1.1. Kompaktní jádérka

U intaktní skupiny se počet jadérek po 24 h snížil z $24,1 \pm 2,6\%$ na $15,6 \pm 2,6\%$, ale u pozitivní kontroly (po podání ethanolu) nedošlo ke změně stavu. U testovaných skupin se 24h po aplikaci počet kompaktních jadérek mírně zvýšil ze $44,6 \pm 3,9\%$ na $52,5 \pm 4,1\%$ u zvířat, jimž bylo podáno 2,5 μ l roztoku. U zvířat s vyšším aplikovaným vzorkem se jejich počet pouze zanedbatelně snížil.

Rozdílly se však objevily mezi kontrolními a larvami po aplikaci látky a to téměř ve 20%. Kontrolní skupině bylo naměřeno po 8h $24,1 \pm 2,6\%$ kompaktních jadérek, a pozitivní kontrole $26 \pm 3,2\%$. U larev, kterým byla aplikována nižší dávka (0,135 mg genisteinu) jich však bylo $44,6 \pm 3,9\%$ a u larev ovlivněných vyšší dávkou (0,54 mg genisteinu) $41,7 \pm 5,7\%$. Po 24h to byla u intaktní skupiny hodnota $15,6 \pm 2,6\%$, a u pozitivní kontroly byla zjištěná hodnota vyšší a to $25,3 \pm 2,0\%$. Po aplikaci genisteinu se počet zvýšil na hodnotu 52,5% u nižší dávky, ale u vyšší dávky dosáhl pouze $38,4 \pm 1,8\%$.



Obr. 2. Kompaktní jádérka

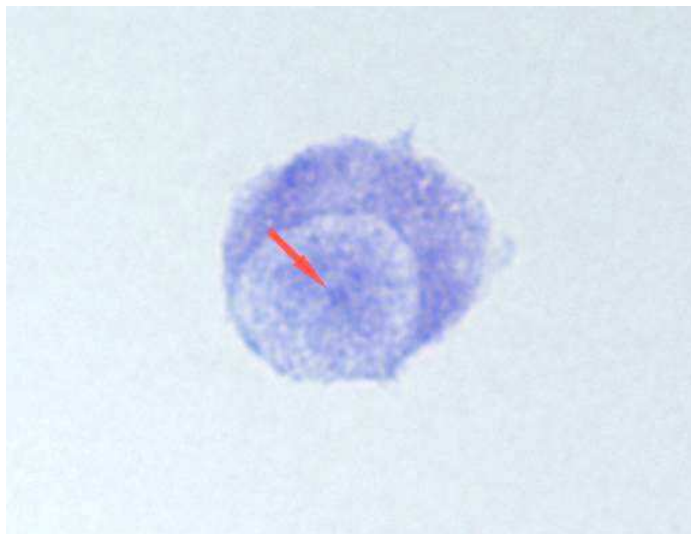


Obr. 3. Změny v počtech kompaktních jadérek; * významné proti pozitivní kontrole po 8 hodinách, # významné proti pozitivní kontrole po 24 hodinách

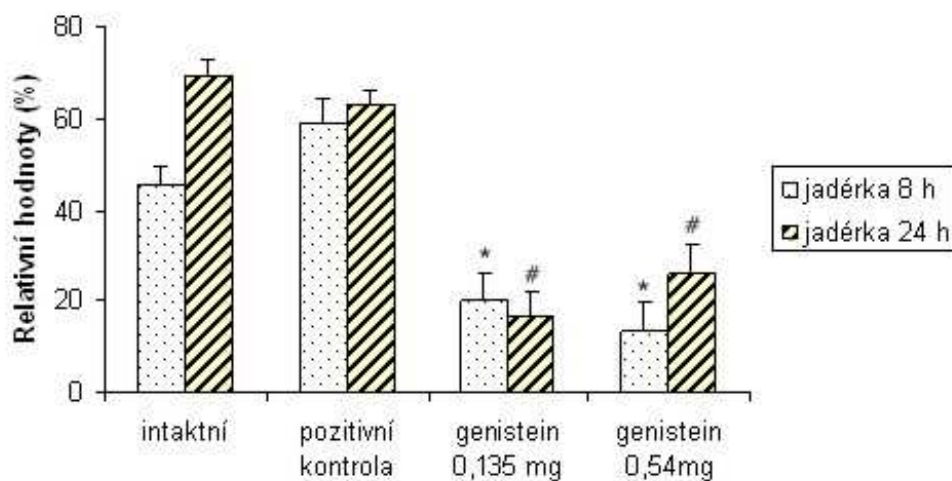
4.1.2. Prsténčitá jadérka

U intaktní skupiny larev se počet prsténčitých jadérek po 24 h výrazně zvýšil z $45,4\% \pm 4,4\%$ na $69,5 \pm 3,3\%$. U pozitivní kontroly byl tento rozdíl pouze nepatrný. U skupiny larev, kterým byla podána nižší dávka, se počet jadérek lehce snížil z $20,3 \pm 5,5\%$ na $16,5 \pm 5,5\%$, zato u vyšší dávky byl počet jadérek po 24h dvojnásobný.

Při porovnání skupin po aplikaci látky a kontrolních vzorků byl prokázán opačný efekt než u kompaktních jadérek. Zatímco u nich se po aplikaci počet zvyšoval, u prsténčitých jadérek se snížil o polovinu a více. Po 8h byla u kontrolní skupiny zaznamenána hodnota $45,4 \pm 4,4\%$ a u pozitivní kontroly $59,1 \pm 5,5\%$. Po aplikaci nižší dávky testované látky se tento počet snížil na $20,3 \pm 5,5\%$ a u vyšší dávky na $13,4 \pm 6,2\%$. Po 24h došlo u kontrolních jedinců k dalšímu navýšení počtu prsténčitých jadérek. U kontrolní skupiny byla zaznamenána koncentrace $69,5 \pm 3,3\%$ a u pozitivní kontroly $62,9 \pm 3,2\%$. Po aplikaci testované látky se počet jadérek opět snížil, a to u nižší dávky na $16,5\%$ a u vyšší dávky došlo k určitému navýšení na $26,0 \pm 6,4\%$. U larev s aplikovanou vyšší dávkou genisteinu po 8 hodinách působení však byla tato hodnota $13,4 \pm 6,2\%$, tedy výrazně nižší.



Obr. 4. Prstěncité jádro

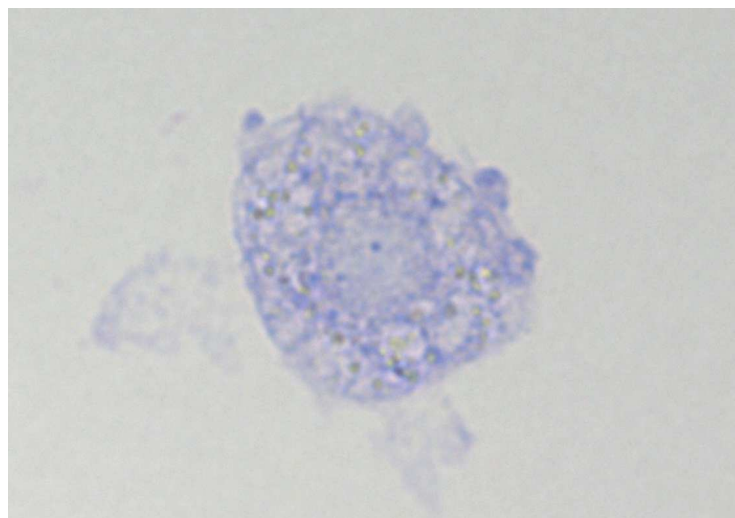


Obr. 5. Změny v počtech prstěncitých jadérek; symboly jako u obr. 3.

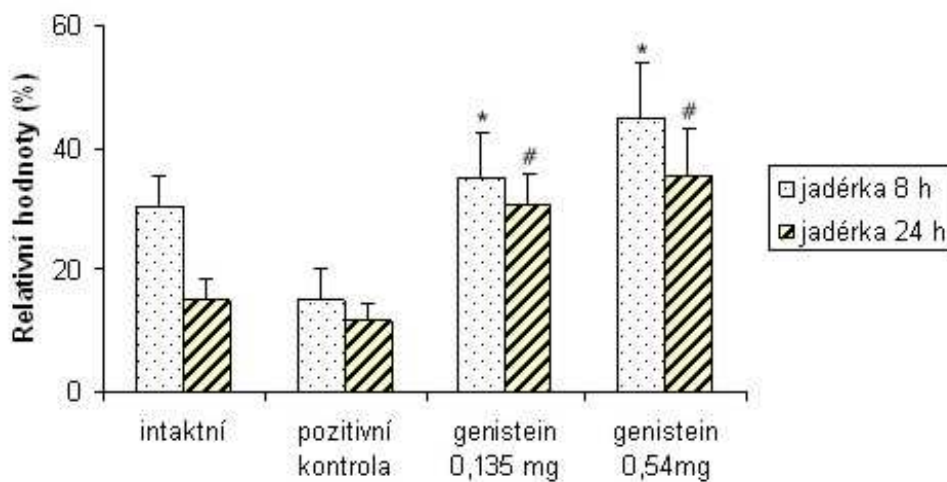
4.1.3. Mikrojadérka

U intaktní skupiny larev po 24h klesl počet mikrojadérek na polovinu, ale u pozitivní kontroly byl rozdíl nepatrný. Po nižší aplikaci byl rozdíl také nepatrný, ale u vyšší se po 24h počet snížil z $45,0 \pm 9,2\%$ na $35,5 \pm 7,8\%$.

Po 8h nebyly mezi oběma skupinami nebyly shledány výrazné rozdíly. Pouze u pozitivní kontroly byla hodnota o polovinu nižší. Rozdíly bylo možné pozorovat až po 24h, kde intaktní skupina měla $15,0 \pm 3,4\%$ mikrojadérek a pozitivní kontrola $11,9 \pm 2,5\%$. Naproti tomu u larev ovlivněných testovanou látkou došlo k navýšení počtu mikrojadérek. Po aplikaci nižší dávky na $31,0 \pm 4,8\%$ a u vyšší dávky na $35,5 \pm 7,8\%$.



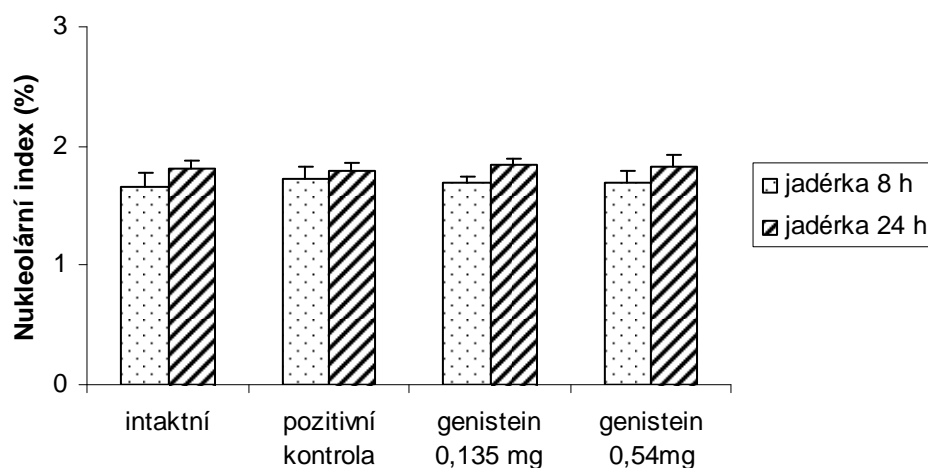
Obr. 6. Kompaktní jádérko a mikrojadérko



Obr. 7. Změny v počtech mikrojadérek; symboly jako u obr. 3.

4.1.4. Nukleolární index

Počty jadérek u intaktních skupin larev v porovnání s larvami po aplikaci látky se lišil jen velmi málo. U hemocytů *S. littoralis* byl nukleolární index stanoven v rozmezí od $1,66 \pm 0,12$ do $1,84 \pm 0,05$.

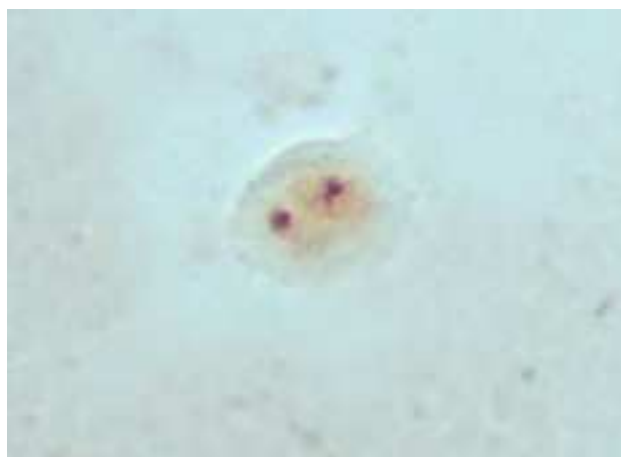


Obr. 8. Nukleolární index hemocytů – barvení toluidinovou modří

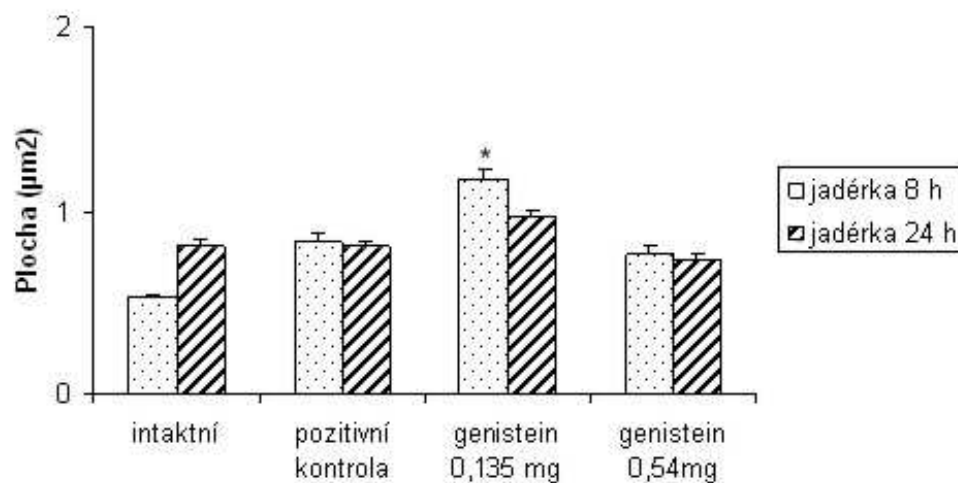
4.2. Barvení stříbrem

4.2.1. Plocha jadérek

Plocha jadérek se pohybovala od $0,052 \mu\text{m}^2 \pm 0,02$ do $1,17 \mu\text{m}^2 \pm 0,06$. Pokud jsme porovnali kontrolní skupiny se skupinami larev po aplikování látky, bylo pozorovatelné zvětšení plochy u pozitivní kontroly a poté u skupiny, které byla aplikována nižší dávka. Naopak po aplikaci vyšší dávky se plocha opět snížila.



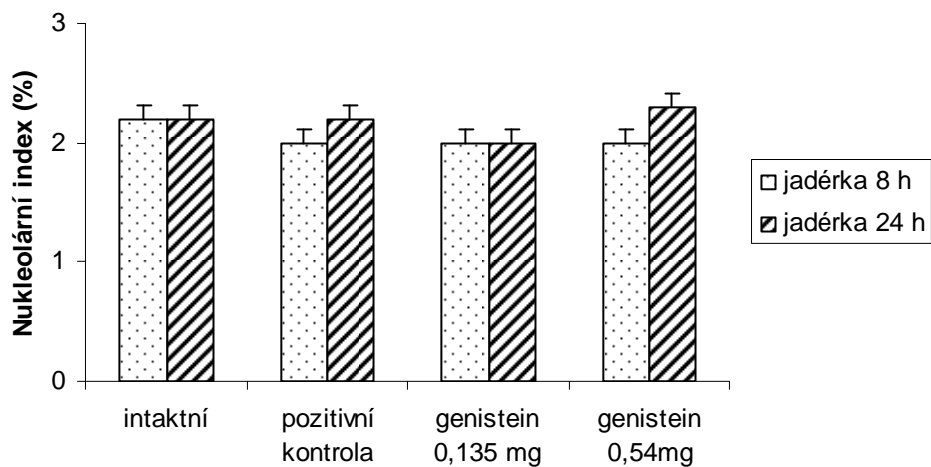
Obr. 9. Jadérka - barvení stříbrem



Obr. 10. Plocha jadérek (μm^2); * významné proti pozitivní kontrole po 8 hodinách

4.2.2. Nukleolární index

Při barvení stříbrem se nukleolární index oproti barvení toluidinovou modří mírně zvýšil. Hodnoty se pohybovaly v rozmezí od $2,0 \pm 0,11$ do $2,3 \pm 0,12$, ale přesto lze říci, že tyto buňky měly v průměru 2 jadérka. Vyšší počty byly spíše výjimečné. Dále bylo zjištěno, že po působení genisteinu se hodnoty nukleolárního indexu významně nezměnily.

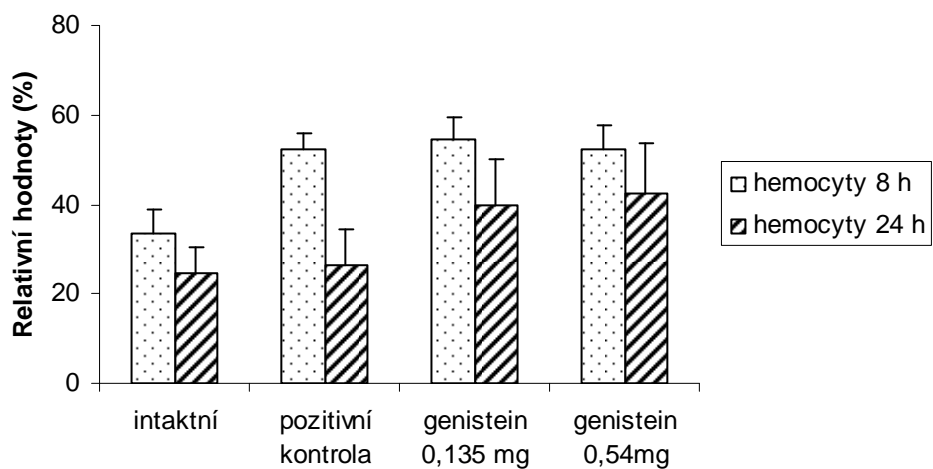


Obr. 11. Nukleolární index hemocytů – AgNOR

4.3. Pappenheimovo panoptické barvení

4.3.1. Malé granulocyty

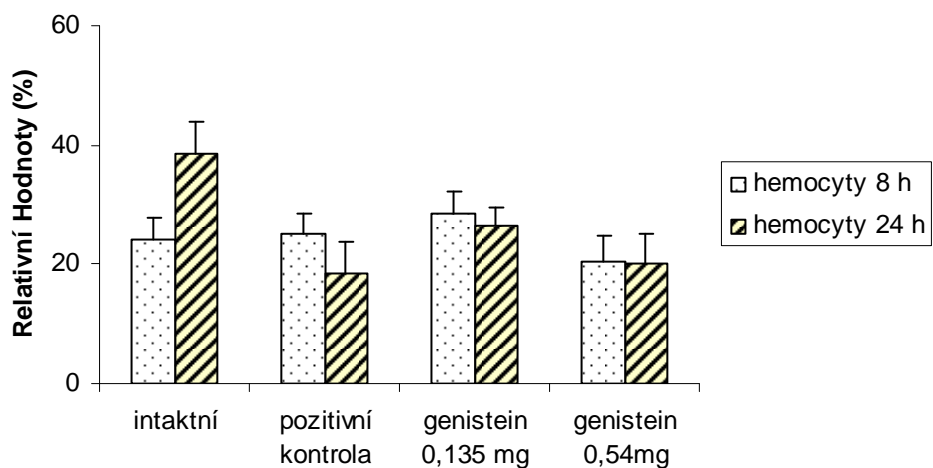
Počty malých granulocytů se měnily jak v čase, tak po působení genisteinu. Po 24h se hodnoty snížily. U intaktní skupiny z $33,6 \pm 5,5\%$ na $24,4 \pm 6,2\%$, u pozitivní kontroly z $52,3 \pm 3,5\%$ na $26,4 \pm 8,2\%$. U skupiny s nižší aplikovanou dávkou klesla hodnota z $54,4 \pm 5,0\%$ na $39,6 \pm 10,6\%$ a u vyšší aplikace je to obdobné, za $52,2 \pm 5,6\%$ na $42,6 \pm 11,0\%$. Bohužel po 24h aplikaci nastaly velké odchylky od zjištěných hodnot. Z tabulky je patrné, že i po působení genisteinu se hodnoty zvýšily. K těmto změnám došlo asi o 20 % více u intaktní skupiny. Jedinou výjimkou byla hodnota u pozitivní kontroly po 8h, která se oproti ostatním zvýšila.



Obr. 12. Změny v relativním počtu malých granulocytů

4.3.2. Velké granulocyty

V počtech velkých granulocytů byl rozdíl pouze po 24h hodinách u intaktní skupiny, ostatní rozdíly v časové ose i mezi aplikacemi byly malé.

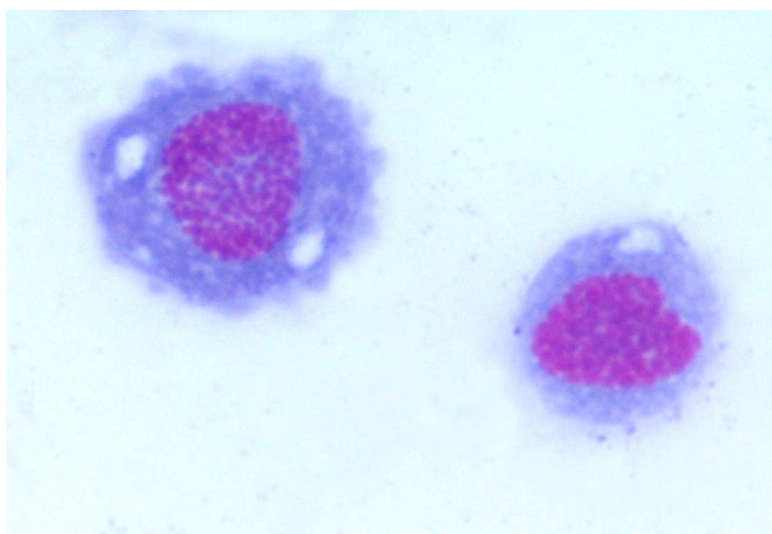


Obr. 13. Změny v relativním počtu velkých granulocytů

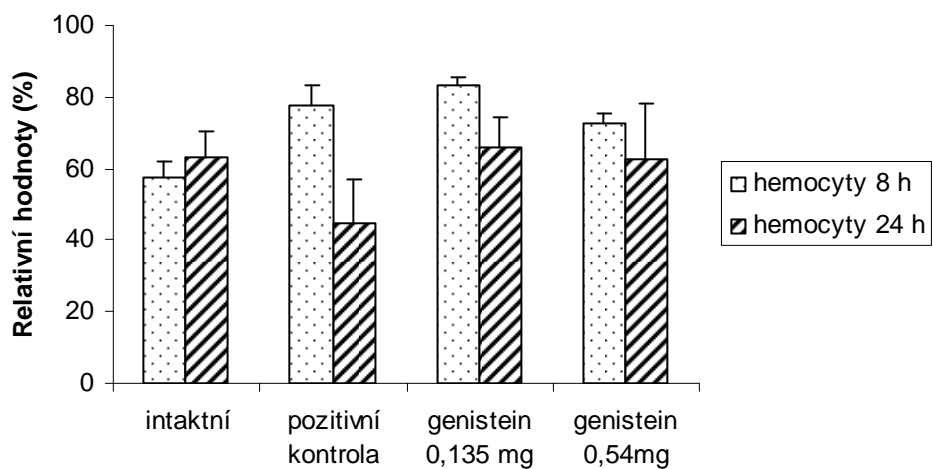
4.3.3. *Granulocyty*

Celkový počet granulocytů se vyjma intaktní skupiny po 24 hodinách snížil. U pozitivní kontroly to bylo ze $77,5 \pm 5,9\%$ na $44,8 \pm 12,4\%$, u nižší dávky z $83 \pm 2,6\%$ na $66 \pm 8,4\%$ a u vyšší dávky z $72,8 \pm 2,5\%$ na $62,6 \pm 15,8\%$, ale odchylka od průměrné hodnoty byla větší.

Mezi kontrolními a aplikovanými skupinami v jednom časovém horizontu byly změny malé nebo nepravidelné.



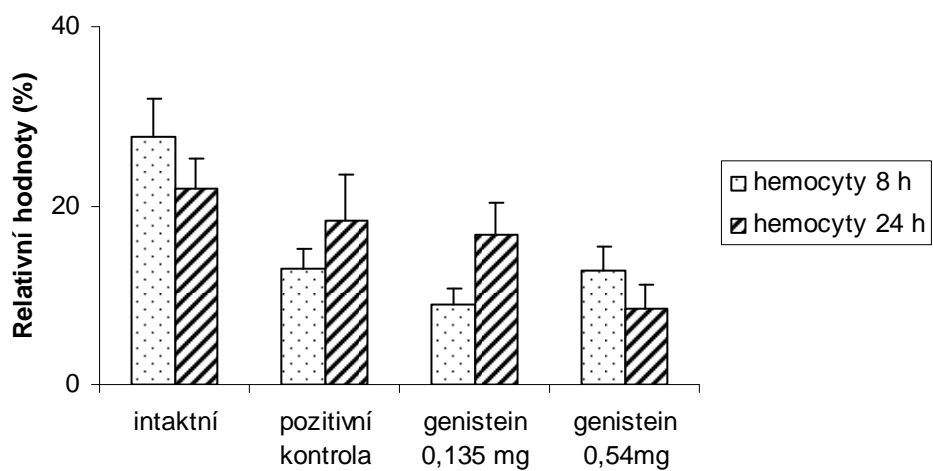
Obr. 14. **Granulocyty**



Obr. 15. Změny v relativním počtu všech granulocytů

4.3.4. Malé prohemocyty

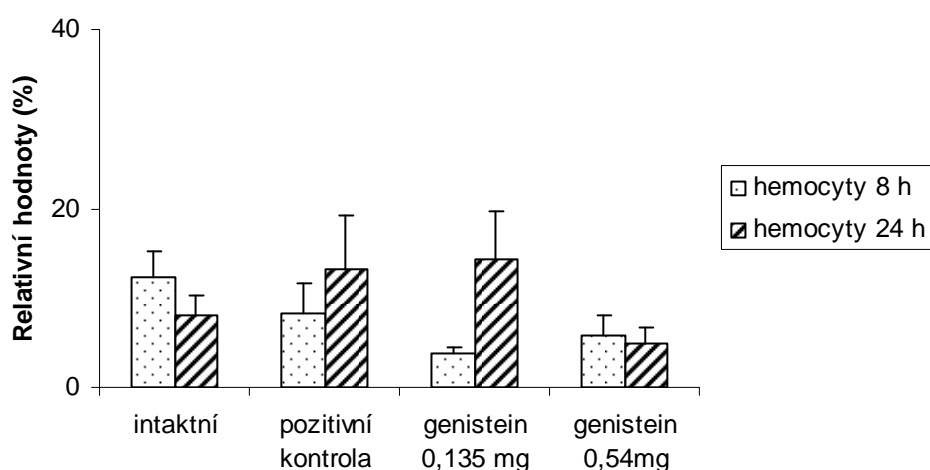
U malých prohemocytů nenastaly žádné významně prokazatelné změny, výsledky byly nesourodé. Nešlo z nich tedy prokázat žádný vliv genisteinu.



Obr. 16. Změny v relativním počtu malých prohemocytů

4.3.5. Velké prohemocyty

U velkých prohemocytů se hodnoty v časové ose významně nezměnily. Pokud jsme srovnali kontrolní skupiny larev se skupinami, kterým byla látka aplikována, zaznamenali jsme snížení počtu prohemocytů po aplikaci látky. Intaktní skupina po 8h měla $12,2 \pm 3,0\%$ a u pozitivní kontroly se jednalo o $8,3 \pm 3,3\%$. U skupin po aplikaci látky byl počet prohemocytů snížen u nižší dávky na $3,8 \pm 0,7\%$ a u vyšší na $5,8 \pm 2,3\%$. Po 24h dosáhla intaktní skupina hodnoty $8 \pm 2,3\%$ a pozitivní kontrola $13,2 \pm 6,0\%$. Výjimkou byla skupina s nižším množstvím aplikované látky, u které se počet hemocytů nesnížil, ale oproti kontrolním skupinám zůstal na blízké hodnotě $14,2 \pm 5,5\%$. Počty velkých prohemocytů se po aplikaci vyšší dávky snížily obdobně jako po 8h.

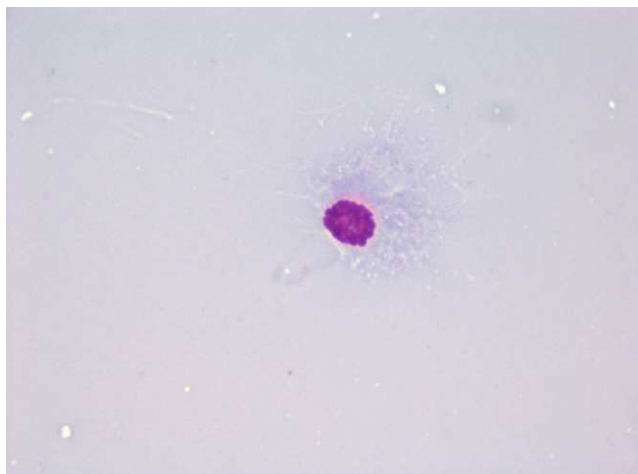


Obr.17. Změny v relativním počtu velkých prohemocytů

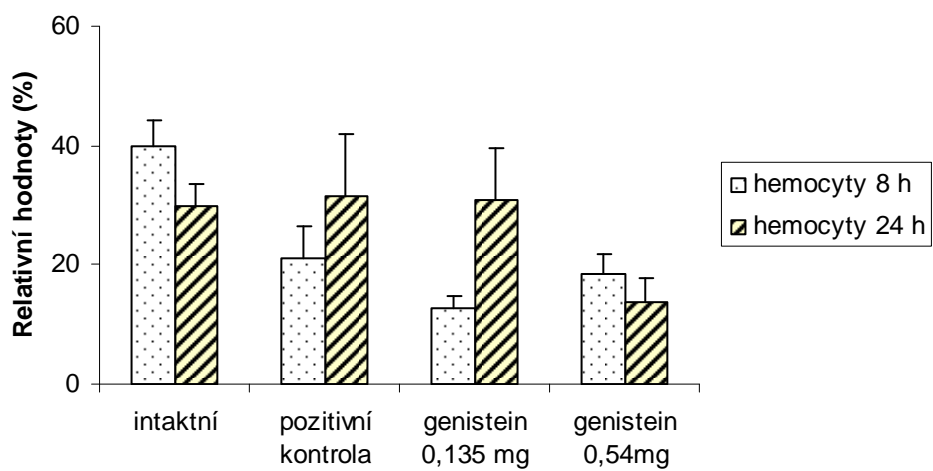
4.3.6. Prohemocyty

V celkovém počtu prohemocytů byly výsledky v porovnání působení po 8h a 24h rozdílné a nebylo možné vyčíst žádnou dynamiku.

Při porovnání kontrolních skupin a skupin larev po aplikaci látky došlo pravděpodobně zvířat vystavených působení látky spíše ke snížení počtů prohemocytů. Tento fakt však nebylo možné jednoznačně prokázat..



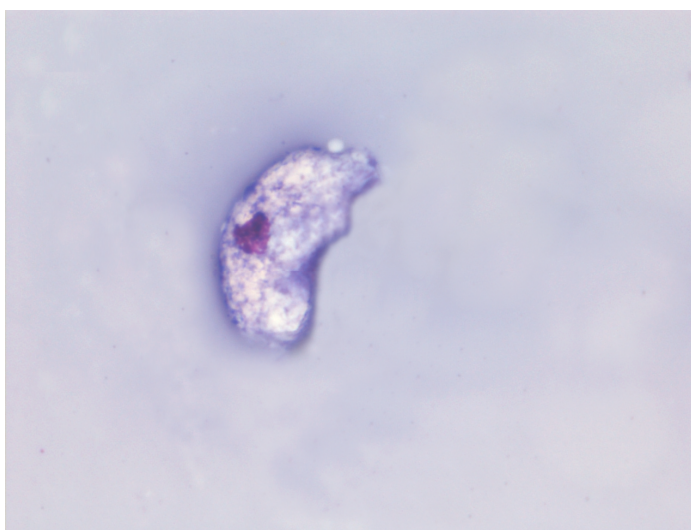
Obr. 18. Prohemocyt



Obr. 19. Změny v relativním počtu všech prohemocytů

4.3.7. Sferulocyty

Z počtu sferulocytů bylo možné vyčíst, že jak v časové ose, tak při porovnání skupin larev po aplikaci a kontrolních dochází spíše ke zvýšení jejich počtů. Hodnoty byly velmi nízké, ba dokonce i nulové. Vystala tedy otázka, do jaké míry výsledky vypovídají o vlivu genisteinu na tyto buňky.



Obr. 20. Sferulocyt

Tab. 1. Změny v počtech sferulocytů (relativní hodnoty, %)

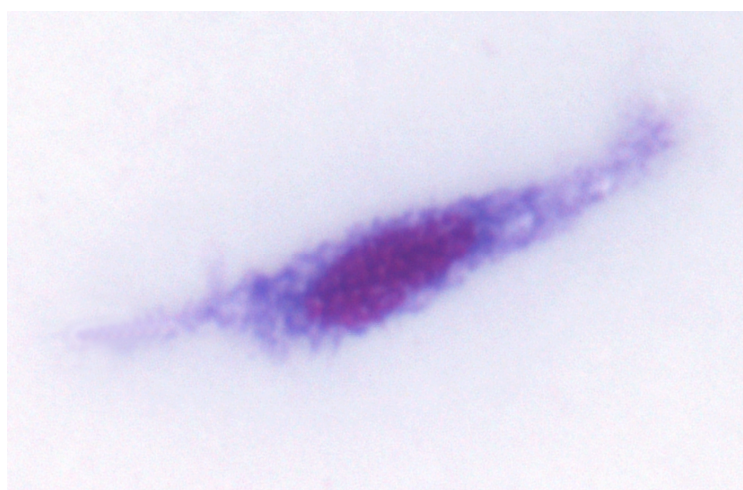
	počet hemocytů	± SEM	počet hemocytů	± SEM
	8 h		24 h	
intaktní	0,2	0,2	1	0,5
pozitivní kontrola	0	0	0,6	0,4
genistein 0,135 mg	1,2*	0,2	2,2	1,0
genistein 0,54 mg	0	0	1	0,8

* významné proti pozitivní kontrole po 8 hodinách

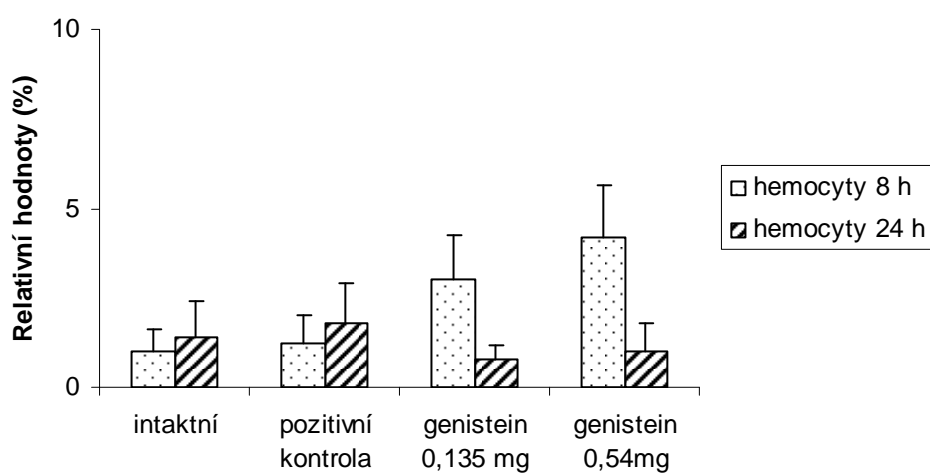
4.3.8. Plasmacyty

U plasmacytů byly výsledky obdobné jako u sferulocytů. Těchto buněk bylo v hemolymfě více než sferulocytů, ale přesto byly jejich hodnoty velmi nízké.

Z tabulky vyplynulo, že po 8h působení genisteinu se počet buněk u skupin po aplikaci látky zvýšil. U intaktní skupiny tyto hodnoty byly $1 \pm 0,6\%$ a u pozitivní kontroly $1,3 \pm 0,8\%$. Po aplikaci nižší dávky pak $3 \pm 1,3\%$ a u vyšší $4,2 \pm 1,4\%$. Avšak po 24 h se hodnoty u všech skupin pohybovaly okolo 1%.



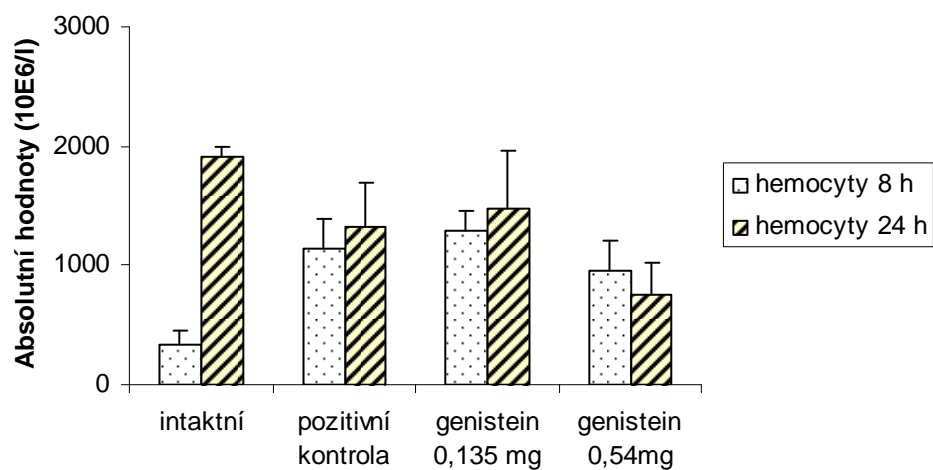
Obr. 21. Plasmatocyt



Obr. 22. Změny v relativním počtu plasmatocytů

4.3.9. Celkový počet hemocytů v litru hemolymfy

Pomocí Bürkerovy komůrky bylo možno stanovit koncentraci všech buněk v 1 litru hemolymfy *S. littoralis* (Boisd.). Výsledky byly velmi různorodé, proto není možné prokázat vliv genisteinu.



Obr. 23. Absolutní počet hemocytů v 1litru hemolymfy (10⁶)

5. Diskuse:

V hemolymfě larev *Spodoptera littoralis* (Boisd.) byly nalezeny 4 typy hemocytů: granulocyty, prohemocyty, plasmatomyty a sferulocyty. Granulocyty a prohemocyty byly rozlišovány na malé a velké, ale neznáme mezi nimi fyziologické odlišnosti. V pracích jiných autorů byly nalezeny další 3 typy hemocytů, jenž se vyskytují u řádu Lepidoptera. Jsou to oenocytoidy, koagulocyty a adipohemocyty (Gupta, 1979). U larev *S. littoralis* bylo pozorováno nejvíce granulocytů (45 – 80%), méně prohemocytů (13 – 40%) a nejméně plasmatomytů (2 - 3%) a sferulocytů (0 – 2%). Změny v poměru jednotlivých hemocytů po působení genisteinu byly různorodé a nemůžeme jednoznačně říci, že genistein tento poměr ovlivňuje. Přesto je nutné zmínit, že po 8h od aplikace genisteinu došlo k mírnému zvýšení počtu malých granulocytů. Zároveň se zvýšila hodnota počtu všech granulocytů. Po 24h od aplikace došlo k mírnému poklesu. U velkých prohemocytů se tento počet v závislosti na čase také snížil. U ostatních buněk bylo po 8h pozorovatelné spíše zvýšení počtu po působení genisteinu.

Studiem hemocytů u *S. littoralis* se zabývala práce Gelbič et al. (2006). Při určování diferenciálního počtu našel největší poměr plasmatomytů $57,5 \pm 19,9\%$, dále $28,4 \pm 2,1\%$ granulocytů, $16,2 \pm 8,6\%$ sferulocytů a $1,5 \pm 1,3\%$ oenocytoidů. Ve srovnání s naší prací autor uvádí menší množství granulocytů a větší množství sferulocytů a plasmatomytů. Navíc u těchto larev našel oenocytoidy, ale nepozoroval plasmatomyty.

Řád Lepidoptera studovali Neuwirth (2005), Falleiros et al. (2003) a Lea et al. (2005). Neuwirth (2005) ve své práci sledoval hemocyty u *Galleria mellonella*. Byly zde pozorovány 4 typy hemocytů: plasmatomytoidy, granulární hemocyty, sferulocyty a oenocytoidy. V této práci je zřejmý rozdíl v názvosloví hemocytů. U *Diatraea saccharalis* bylo nalezeno 5 typů. Jednalo se o plasmatomyty, granulocyty, sferulocyty, oenocytoidy a vermicyty (Falleiros et al., 2003). Podle ne zcela jednoznačného názvosloví tedy považují vermicyty za koagulocyty. U *Diatraea saccharalis* bylo

nalezeno nejvíce granulocytů (28,2 – 35,4%) a nejméně prohemocytů (0,3 – 4%). Počet plasmacytů a sferulocytů se pohybuje mezi 20 – 30%.

Lea et al. (2005) uvedl, že během vývoje *Hyalophora cecropia* byly nalezeny rozdílné typy hemocytů. Jednalo se o prohemocyty, plasmacyty, sferulocyty, adipohemocyty a oenocytoidy u prvního instaru, u ostatních instarů již oenocytoidy ani adipohemocyty nebyly zaznamenány. Toto by mohlo znamenat, že jednotlivé typy buněk se proměňují v jiné a u starších zvířat je již nenalezneme, jak uvádí ve své práci Gupta (1979).

Hemocyty u jiných druhů hmyzu se zabýval Sanjayan (1996) u *Spilostethus hospes*, Berger a Slavíčková (2001) u *Periplaneta americana* a Berger et al. (2003). Sanjayan (1996) pozoroval u *S. hospes* prohemocyty, plasmacyty, granulocyty, adipohemocyty a sferulocyty. Z těchto druhů bylo zaznamenáno nejvíce granulocytů (44,65%), což se shoduje s naším pozorováním. Další hodnoty se od *S. littoralis* výrazně liší.

Z práce Berger et al. (2003), která se zabývala působením genisteinu na hmyzí hemocyty, je patrné, že změny v poměrech jednotlivých typů hemocytů u *P. americana* byly po podání genisteinu pouze minimální. Ale je velmi zajímavé, že celkový počet hemocytů u *P. americana* po podání ethanolu nebyl ovlivněn, ale podání genisteinu způsobilo zvýšení jejich koncentrace. Nárůst hemocytů byl zaznamenán ještě 24 hodin po aplikaci, po 24h koncentrace hemocytů klesla na původní hodnoty. Naopak u *Schistocerca gregaria* byly tyto počty sníženy. Z morfologického hlediska se u těchto zvířat nezmiňuje o adipocyttech a plasmacyttech (Berger et al., 2003) a shoduje se s pozorovanými typy hemocytů u *S. littoralis*.

Celkový počet hemocytů v hemolymfě *S. littoralis* se pohyboval od $328,8 \pm 115,3 * 10^6$ do $1908,0 \pm 80,6 * 10^6$ v litru. V práci Berger et al. (2003) byla stanovena u *P. americana* průměrná hodnota hemocytů na $4,78 * 10^8$ v litru u samců a $4,88 * 10^8$ v litru u samic. Sanjayan uvádí u *S. hospes* koncentraci 3262 hemocytů v mm^3 . Hodnoty u *P. americana* se pohybují v rozmezí našich výsledků. Přesto se hodnoty hemocytů u *S. littoralis* pohybují spíše ve vyšších koncentracích než je tomu u *P. americana*, ale jsou nižší než *S. hospes*. V našem případě u *S. littoralis*, nebyly po

působení genisteinu významné změny v koncentraci hemocytů zaznamenány. V práci Gelbič et al. (2006) není koncentrace hemocytů u *S. littoralis* zmíněna.

Morfologické rozlišení jadérek bylo provedeno pomocí barvení toluidinovou modří dle Smetany (Bush a Smetana, 1970). Touto metodou byla nabarvena jádérka a RNA. Všechny typy jadérek u *S. littoralis* se barvily modře až modrofialově. Byla rozlišena jádérka kompaktní, v nichž probíhá syntéza rRNA, prstěnitá, reverzibilně inaktivní a mikrojadérka, která syntézu již ukončila (Bush a Smetana, 1970; Smetana, 2001).

Po provedení všech testů bylo zjištěno, že po podání genisteinu se počet kompaktních jadérek zvýšil a počet prstěnitých snížil, což by znamenalo, že genistein má vliv na aktivitu jadérek, jelikož se po jeho působení zvýšil počet proteosynteticky aktivních jadérek. Bohužel z výsledků ale také vyplynulo, že se zvýšil počet mikrojadérek. Nelze tedy jednoznačně usoudit, zda proteosyntetická aktivita po působení genisteinu stoupá. Dle práce Smetana (2005) je možné, že se kompaktní jádérka mění v mikrojadérka a ta jsou znakem preapoptické fáze. Dle práce Kulling et al. (1997) je indukce mikronukleolů spojena s indukcí chromosomových aberací (zlomy chromatid, delece, inverze).

Plocha jadérek se u *S. littoralis* pohybovala od $0,52 \mu\text{m}^2 \pm 0,02$ u kontrolní skupiny až po $1,17 \mu\text{m}^2 \pm 0,06$ u zvířat po aplikaci. Zvýšení plochy nastalo pouze po aplikaci nižší dávky, tj. 0,135 mg genisteinu. Po aplikaci vyšší dávky genisteinu nenastaly ve srovnání s kontrolními skupinami žádné větší rozdíly. Dle Kavtseviche a Yurky (2006) kvantitativní charakteristika jadérek odráží intenzitu syntézy proteinů.

Pro porovnání průměrná velikost AgNORů u lidských lymfocytů se pohybuje podle jejich výzkumu 0,2 až 3 μm . Smetana (1970) ve své monografii hodnotí velikost jadérek v lidských krevních buňkách jako malé, velké či středně velké. Plochu jadérek u lidských buněk stanovil v rozmezí 1,4 – 8,7 μm^2 .

V práci Černá a Berger (2000) se plocha AgNORů u krysu pohybuje od $1,42 \pm 0,47$ do $1,69 \pm 0,49$. V našem případě se vyskytla i menší jádérka než v této publikaci, ale velikosti lidských jadérek nedosahují. Dokonce i plocha AgNORů u krysu dosahuje

větších hodnot než je tomu u *S. littoralis*. Nejvyšší dosažená hodnota plochy jádérka u *S. littoralis* byla $2,53 \mu\text{m}^2$, ale tato hodnota byla výjimečná.

Při barvení stříbrem byla hodnota nukleolárního indexu o něco vyšší než při barvení toluidinovou modří. Při barvení toluidinovou modří se nukleolární index pohyboval od $1,66 \pm 0,12$ do $1,84 \pm 0,05$ a při barvení stříbrem od $2,0 \pm 0,11$ do $2,3 \pm 0,12$. Tyto hodnoty však nejsou významně rozdílné. Ve většině buněk *S. littoralis* byla při pozorování zastoupena nejvíce 2 jádérka v jedné buňce. V buňkách bylo výjimečně zaznamenáno až 5 jáderek v buňce, například u sferulocytů bylo pozorováno ve většině případů i 4 – 5 jáderek.

Podle výzkumů Smetany (1970) mají lidské buňky 1 - 2 jádérka, výjimečně dokonce i 6, jako je tomu například u myeloblastů, monocytů, proerythroblastů či makronormoblastů (Bush a Smetana, 1970).

Práce Kavtseviche a Yurky (2006) uvádí počet 1 - 4 u lidských lymfocytů. Nejvíce však pozorovali lymfocyty s jedním jádérkem (55 - 77%), méně se dvěma (22-41%) a nejméně se třemi jádérky (0,3 - 0,8%).

U krys byl po barvení stříbrem stanoven nukleolární index na 1,7 – 1,9 (Černá a Berger, 2000). Počet jáderek u *S. littoralis* se shodoval s počtem jáderek v lymfocytech krys. Množství jáderek u lidských buněk záleží na typu lymfocytu, ale je také velmi blízké *S. littoralis*.

Spodoptera littoralis je vhodným hmyzím modelem, který lze snadno chovat, lze mu snadno aplikovat zkoumanou látku a odebírat vzorky hemolymfy. Možnosti zkoumání na tomto druhu jsou stále velmi široké. Bohužel je obtížné porovnávat správnost výsledků, jelikož je málo dostupné literatury týkající se tohoto druhu, zvláště působení genisteinu na nukleoly. V otázkách aktivity nukleolů lze využít srovnání s člověkem. V jednotlivých pracích se značně liší nejen druhy pozorovaných hemocytů, ale i jejich názvosloví a jejich jednotlivé poměry. Přesto lze tyto výsledky porovnat s příbuznými druhy nebo jiným hmyzem.

Pro barvení hemolymfy nebyly používány stejně dlouhé doby barvení jako u lidské krve, ale bylo nutné dané receptury modifikovat pro potřeby práce s hmyzem. Z

důvodů vyššího obsahu tuků v hemolymfě *S. littoralis* (Boisd.) bylo nutné prodloužit expoziční časy pro jednotlivá média. Komplikaci mohlo způsobit i to, že u hmyzu se nejedná o krev. V důsledku otevřené cévní soustavy dochází k míšení vlastní krve s mízou. Proto se také setkáváme s názvem krvomíza neboli hemolymfa. U barvení toluidinovou modří bylo dokonce nutno nechat nátěry 24h zaschnout kvůli lepší fixaci, přestože u lidské krve se barví do 1h po odběru.

6. Závěr:

- V hemolymfě larev *Spodoptera littoralis* (Boisd.) byly nalezeny 4 typy hemocytů: granulocyty, prohemocyty, plasmatocyty a sferulocyty.
- Genistein na jednotlivé typy a koncentraci hemocytů nemá vliv.

- Počty kompaktních jadérek se po působení genisteinu zvýšily.
- Počty prsténčitých jadérek se po působení genisteinu snížily.
- Počty mikrojadérek se po podání genisteinu zvýšily.
- Nukleolární index u *Spodoptera littoralis* (Boisd.) je dvě. Po působení genisteinu se tato hodnota nezměnila.
- Plocha jadérek nebyla genisteinem významně ovlivněna.

7. Seznam použité literatury:

- [1] Berger, J. (2000): Social and ethical issues in exploratory research of biomodels (In Czech). *Kontakt* 2: 144 - 150.
- [2] Berger, J., Slavíčková K. (2001): Morphology of haemocytes of *Pyrrhocoris apterus*. *Cells* 3. 1st edition. České Budějovice: Koop, 2001. 242 p.
- [3] Berger, J., Walczysko, S., Pávková, J., Gutzeit, H. O. (2003): Effekts of genistein on insect haemocytes. *Journal of Applied Biomedicine* 1: 161 - 168.
- [4] Bush, H., Smetana, K. (1970): *The Nucleolus*. 1st edition. New York: Academic Press. 626 p.
- [5] Černá, M., Berger, J. (2000): The AgNOR size in rat blood lymphocytes. *Cells* 2. 1st edidion. České Budějovice: Koop. 189 p.
- [6] Dixon, R. A., Ferreira, D. (2002): Genistein. *Phytochemistry* 60: 205 - 211
- [7] Falleiros, Â. M. F., Bombonato, M. T. S., Gregório, E. A. (2003): Ultrastructural and quantitative studies of hemocytes in the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Brazilian Archives of Biology and Technology* 45: 287 - 294.
- [8] Gelbič, I., Strbáčková, J., Berger, J. (2006): Influence of metyrapone on the morphology of hemocytes of the egyptian cotton leafworm *Spodoptera littoralis* (Boisd.). *Zoological Studies* 45: 371 - 377.
- [9] Gerbi, S. A. (1997): The nucleolus: then and now. *Chromosoma* 105: 385-387.
- [10] Gupta, A. P. (1978): *Insect hemocytes: development, forms, functions and techniques*. 1st edition. London: Cambridge University Press. 614 p.
- [11] Hernandez-Verdun, D. (2004): The nucleolus: functional organization and assembly. *Journal of Applied Biomedicine* 2: 57 - 69.
- [12] Kavtsevich, N. N., Yurko, A. S. (2006): Nucleolus organizer activity in lymphocytes of harp seals of different ages. *Cell Biology* 416: 409 - 411.
- [13] Kulling, S. E., Rosenberg, B., Jacobs, E., Metzler, M. (1999): The phytoestrogens coumoestrol and genistein induce structural chromosomal

aberrations in cultured human peripheral blood lymphocytes. Archives of Toxicology 73: 50 - 54.

- [14] Lea, M. S., Gilbert, L. I. (2005): The hemocytes of *Hyalophora cecropia* (Lepidoptera). Journal of Morphology 118: 197 - 215.
- [15] Medina, F. J. (2001): The organization of the expression of ribosomal genes in the plant cell nucleolus: from ultrastructural cytochemistry to run-on in situ. Cells 3. 1st edition. České Budějovice: Koop, 2001. 242 p.
- [16] Neuwirth, M. (2005): The structure of the hemocytes of *Galleria mellonella* (Lepidoptera). Journal of Morphology 139: 105 - 123.
- [17] Pěkníčková, J., Nováková, V., Buckiova, D., Boubelík, M. (2007): Effect of endocrine disruptors on mammalian fertility. European Andrology 1: 40.
- [18] Polívková, Z., Langová, M., Šmerák, P. et al. (2006): Antimutagenic effect of genistein. Czech Journal of Food Science 24: 119 – 126.
- [19] Salvi, M., Brunati, A. M., Clari, G., Toninello, A. (2002): Interaction of genistein with the mitochondrial electron transport chain results in opening of the membrane transition pore. Biochimica et Biophysica Acta 1556: 187 - 196.
- [20] Sanjayan, K. P., Ravikumar, T., Alberts, S. (1966): Changes in the haemocyte profile of *Spilostethus hospes* (Fab.) (Heteroptera: Lygaeidae) in relation to eclosion sex and mating. Journal of Biosciences 6: 781 - 788.
- [21] Smetana, K. (2000): Nucleoli in non-neoplastic and malignant cells. Cells 2. 1st edition. České Budějovice: Koop. 189 p.
- [22] Smetana, K. (2005): Are nucleoli useful markers of various cell states? Advances in cell and molecular biology. 1st edition. České Budějovice: Koop Publishing. 212p.
- [23] Smetana, K., Jirásková, I., Perlaky, L., Bush, H. (1999): The silver reaction of nucleolar proteins in the main structural compartments of ring-shaped nucleoli in smear preparations. Acta Histochemica 101: 167 - 183.
- [24] Smetana, Karel. (2001): Terminal maturation, programmed cell death and nucleoli. Cells 3. 1st edition. České Budějovice: Koop. 242 p.

- [25] Svobodová, A., Psotová, J., Walterová, D. (2003): Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage. A review. *Biomedical Papers* 147: 137 - 145.
- [26] Tesseyre, A., Michalak, K. (2005): Genistein inhibits the activity of Kv1.3 potassium channels in human T lymphocytes. *The Journal of Membrane Biology* 205: 71 - 79.
- [27] Ulanowska, K., Tkaczyk, A., Konopa, G., Węgrzyn, G. (2006): Differential antibacterial activity of genistein arising from global inhibition of DNA, RNA and protein synthesis in some bacterial strains. *Archives of Microbiology* 184: 271 - 278
- [28] Wang, Y., Yaping, E., Zhang, X. et al. (1998): Inhibition of ultraviolet (UVB-induced) c-fos and c-jun expression in vivo by protein kinase inhibitor genistein. *Carcinogenesis* 19: 649 - 654.
- [29] Wei, H., Cai, Q., Rahn, R.O. (1996): Inhibition of UV light and fenton reaction-induced oxidative DNA damage by the soybean isoflavone genistein. *Carcinogenesis* 17: 73 - 77.

8. Klíčová slova:

Jadérko

Genistein

Spodoptera littoralis

Hemocyty

AgNOR

Barvení toluidinovou modří

Pappenheimovo panoptické barvení