

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Zdravotně sociální fakulta

Cirkadiánní změny hemocytů *Spodoptera littoralis*

Bakalářská práce

Autor: Terezie Trefilová

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

Datum odevzdání: 17.8.2009

Circadian changes in hemocytes in *Spodoptera littoralis*

Abstrakt

This work is a study of the morphology of hemocytes and stability of the basic non-pathological hematological levels during 24 hours. *Spodoptera littoralis*. (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae) in the sixth instar was used as the biological model. Light microscopy was the technique used to observe the hemocytes. Prior to the microscopy, preparations were made from the hemolymph and stained by Pappenheim's staining method. This is a method which is routinely used in veterinary as well as human laboratory practice in hematology. Six types of hemocytes were observed: small granulocytes (sGR), large granulocytes (lGR), small prohemocytes (sPR), large prohemocytes (lPR), spherulocytes (SP), and plasmatocytes (PL). Pappenheim's staining also enabled apoptosis to be followed.

The knowledge of circadian changes in hemocytes in *S. littoralis* is very important if this animal is to be employed as a new biological model, for instance, for investigations in immunology, hematotoxicology or pharmacotoxicology. Changes in the levels of some substances can be physiological even if lying beyond the reference level limits (Knapp et al., 1984).

We found the various hemocyte counts varying throughout the day. At midnight, the sPR and lPR counts are lowest while the apoptotic cell and lGR counts are highest.

We tested the use of an ELISA reader (Sunrise, Tecan) (which is based on the photometric principle) with a view to increasing the precision and shortening the time of analysis. However, due to the large spans of concentrations, viz. roughly from 2 mmol/l to 30 mmol/l, the use of the ELISA reader was found unsuitable.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Cirkadiánní změny hemocytů *Spodoptera littoralis* vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které uvádím v příložené bibliografii.

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 jejich internetových stránkách.

V Českých Budějovicích

.....

Podpis studenta

Poděkování:

Učenec v laboratoři není jen odborník, je to dítě, které hledí na vědu jako na pohádku. Vidí ve vědě krásu.

Marie Curieová-Sklodovská

Ráda bych tímto chtěla poděkovat svému vedoucímu práce panu prof. RNDr. Josefu Bergerovi, CSc. za odborné vedení bakalářské práce, při které mě mimo jiné naučil vidět vědu jako pohádku.

Dále děkuji panu doc. RNDr. Ivanovi Gelbičovi, CSc. z Entomologického ústavu AV ČR za poskytnutí experimentálních zvířat.

Obsah

1.	ÚVOD	6
2.	SOUČASNÝ STAV	7
2.1	Alternativní biomodely	7
2.2	Chronobiologie	8
2.2.1	Chronohematologie	8
2.3	Imunitní systém	9
2.3.1	Buněčné složky imunity bezobratlých	10
2.3.2	Humorální složky imunity bezobratlých	10
2.4	Hemocyty	11
2.4.1	Klasifikace hemocytů	11
2.4.2	Apoptóza	13
2.4.3	Metody rozpoznávání hemocytů	13
2.5	Koncentrace hemocytů	14
3.	CÍLE PRÁCE	16
4.	METODIKA	17
4.1	Odběr	17
4.2	Panoptické barvení dle Pappenheima	17
4.3	Koncentrace hemocytů	18
4.4	Statistické zpracování dat	18
5.	VÝSLEDKY	19
5.1	Morfologie hemocytů	19
5.2	Zastoupení jednotlivých hemocytů	23
5.3	Diferenciální rozpočet hemocytů (DHC)	23
5.4	Koncentrace hemocytů	29
6.	DISKUZE	31
7.	ZÁVĚR	35
8.	LITERATURA	36
9.	KLÍČOVÁ SLOVA	43
10.	PŘÍLOHY	44

1. ÚVOD

V současné době jsou ve výzkumu v oblasti laboratorní hematologie, imunologie i toxikologie velmi oblíbenými, experimentálními živočichy, bezobratlí. Tento fakt se opírá o skutečnost, že nejsou zdaleka tak náročný na chov, jako obratlovci. Jejich rozmnožování a vývoj umožňuje postupovat ve výzkumu rychleji a upadá zde i mnoho etických problémů.

Četnými studii byla prozkoumána hemolymfa řady bezobratlých, prokázala se přítomnost krevních buněk, následovalo jejich popisování, zjištění funkce, třídění i klasifikace. Aby se hemocyty bezobratlých prozkoumaly opravdu důkladně a nedocházelo k ovlivnění výsledků kvůli neznalosti, nesmíme opomínat chronoematologii, která je nedílnou součástí laboratorní a srovnávací hematologie. Například při studování hematotoxicity látek, nemusí být úbytek hemocytů způsoben toxickou látkou, nýbrž se může jednat o zcela fyziologický jev v důsledku biorytmů.

Záměrem naší práce je zjištění počtu hemocytů modelového živočicha, ve standardních časových intervalech (po třech hodinách) během 24 hodin. Rozhodli jsme se pro využití Pappenheimova barvení hemolymfy k diferenciaci krevních buněk a využití spektroskopického měření pro zjištění koncentrace hemocytů v hemolyfě.

Zjištěním počtů jednotlivých hemocytů přispějeme velkou měrou k přesnější diagnostice v experimentální laboratorní hematologii i v řadě dalších oborů.

2. SOUČASNÝ STAV

2.1 *Alternativní biomodely*

V biomedicínských studiích týkajících se ověřování nových léčebných postupů a testování bezpečnosti, se využívá především savců díky jejich fylogenetické příbuznosti s člověkem (Levine et al., 2004).

Pokusy na zvířatech podléhají právním omezením, které odráží kulturní, etické, politické i ekonomické vlivy dané země. Jejich používání tak naráží na řadu problémů. A to se týká i využití obratlovců, a právě proto se neustále hledají a následně využívají nové biomodely. V poslední době je to zejména využití kmenových buněk. Využití kmenových buněk však podléhá ještě větším etickým problémům, než využití obratlovců, vzhledem k náročnosti se zde nedá uvažovat ani o ekonomické výhodě (Paixão, 1999; Bradshaw, 2002; Berger, 2003).

Z těchto důvodů se o hmyzu uvažuje jako o možném biomodelu ke zkoumání především v preklinických imunotoxikologických studiích pro hematotoxikologický screening (Berger a Slavíčková 2008). Ani zde se zatím neuvažuje o úplné náhradě za savce a ostatní obratlovce, kteří pravděpodobně zůstanou i nadále nedílnou součástí výzkumů a to zejména ve zkoumání toxicity na embryonální vývoj.

V současné době jsou ve výzkumu v oblasti laboratorní hematologie, imunologie i toxikologie velmi oblíbenými, experimentálními živočichy, bezobratlí. Tento fakt se opírá o skutečnost, že nejsou zdaleka tak náročný na chov, jako obratlovci. Jejich rozmnožování a vývoj umožňuje postupovat ve výzkumu rychleji a upadá zde i mnoho etických problémů (Berger, 2005).

Jedním z největších problémů využití hmyzu je nedostatečná znalost jejich fyziologických funkcí a hodnot. Tak je tomu i v experimentální hematologii, kde nejsou zcela prozkoumány hemocyty hmyzu přítomné v hemolymfě. Byly sice již v mnoha vědeckých pracích předmětem zkoumání. Avšak i přesto

narážíme na určitou nesourodost jak nomenklatury, tak objevených hemocytů, ale i na určení jejich funkcí, které nejsou zcela prozkoumány. Připisujeme to k poměrně vysoké fyziologické strukturní i funkční variabilitě, omezenému množství objemu hemolymfy, použití rozdílných metod pozorování, laboratorních postupů, technik, zaleží také na podmínkách experimentu, které nejsou standardizované (Pech et al. 1994; Strand a Johnson, 1996).

2.2 Chronobiologie

Tento multidisciplinární vědní obor se zabývá otázkou vnitřních fyziologických pochodů, probíhajících v určitých intervalech v biologickém systému. „Chrono“= tykající se času, „biologie“ se zabývá studiem života. Hrají zde roli jak rytmy exogenní, tak endogenní. Mezi rytmy exogenní řadíme střídání světla a tmy, teplotní cykly, sociální aspekty aj. Zatímco endogenní sledují chemické pohody v organismu, které jsou vnitřním zdrojem rytmicity. (Halberg 1969; Halberg et al. 2003)

Nejpoužívanější rytmus je cirkadiánní („circa“ = asi, „dian“ = den) s periodou $t = 24 \text{ h } (\pm 2)$ hod. Mezi další řadíme např. ultradiánní $t < 20$ hod u nich můžeme předpokládat, že nejsou regulovány enviromentálními cykly (Berger, 2004), infradiánní s $t > 28$ hod, nebo také hojně užívaný cirkanuální (Karsch et al., 1989).

Chronobiologická studia zahrnují srovnávací anatomii, fyziologii, molekulární biologii, etiologii organismů v mechanismech biologických rytmů, další hlediska zahrnují vývoj a reprodukci.

2.2.1 Chronohematologie

Pokud ovšem chceme používat nové biomodely v preklinických studiích, je žádoucí znát jejich fyziologické hodnoty z důvodu maximální přesnosti predikce (Knapp et. al., 1984; Klerman, 2005).

Znalost rytmů v hematologii je důležitá pro lékařské laboratoře i srovnávací patologii (Berger, 2006). Změny v hladinách některých látek mohou

být fyziologické a to, i když jsou mimo hranici referenčních hodnot (Knapp et al., 1984). Jako je tomu např. u melatoninu – noční hormon, který je zvýšený zejména večer a přibližně 2 hodiny po probuzení zůstává fyziologicky zvýšen (Cajochen et al., 2003).

V posledních letech je chronohematologie předmětem velkých diskuzí. Publikované nálezy totiž poukazují na přítomnost cirkadiálních rytmů v hematoimuním systému, které nejsou zcela závislé na suprachiasmatickém jádru. Denní rytmicita u hmyzu je řízena stimulatorem lokalizovaným v mozku blízko očního laloku. Toto je přizpůsobeno enviromentálním cyklům jako je střídání světla a tmy, teplotou, výživou a mnoha dalšími aspekty (Berger, 2004). Hmyz byl mezi prvními zvířaty, u kterých se toto pozorovalo a lokalizovalo, následovali další studie, které ukázali podobnost se savci (Förster, 2004).

Cirkadiální rytmy jsou řízeny hodinovými geny, jejichž proteiny se přepíše téměř do 10 % genomu. Našla se řada proteinů, vytvářených neurony mozku, které mají vliv na cirkadiální rytmy např. u Lepidopter je to PER, CLK A CYC (Förster, 2005). To by ovšem znamenalo, že denní rytmicita není lokalizována pouze přes oční lalok, ale nacházela by se také v centrálním mozku (blízko neuroendokrinního systému). Toto připomíná situaci u obratlovců. U savců je stimulatorem suprachiasmatická jádra v hypotalamu, ten je spojený s vizuálním systémem (Förster, 2005) a s největší pravděpodobností ovlivňuje hematopoetický systém a imunitní reakce, s vlivem především na leukocyty (Knapp et al., 1984).

O roli hodinových genů v hematopoetickém systému a hematocytech doposud víme velmi málo.

2.3 Imunitní systém

U lidí se složky imunity rozdělují podle způsobu rozpoznání antigenu na specifické a nespecifické. Specifické složky jsou fylogeneticky mladší než nespecifické a popsány jsou až u obratlovců. Podle toho zda se efektorové části imunitní reakce účastní humorální faktory nebo buňky se složky imunity dělí na

humorální a buněčné. U hmyzu se vyskytuje pouze nespecifická složka imunity (Fučíková; Ribeiro et al., 2006). Hmyzí imunitní systém je přesto schopen zajistit obranu před patogeny, parazity, cizorodými částicemi i zraněním. (Lackie, 1983; Pech, 1995; Lavine et al., 2002; Jalali et al. 2008). Základem imunitní reakce je schopnost rozeznávání vlastního od cizího a to na základě chemických nebo fyziologických vlastností jejich povrchů.

2.3.1 Buněčné složky imunity u bezobratlých

Základní buněčnou imunitní odpovědí je *fagocytóza* hemocyty (krevními buňkami hmyzu), zejména granulocyty. Dalším mechanismem buněčné imunity je *nodulace*, při které je cizorodý objekt obklopen velkým počtem granulocytů a plazmatocytů. Do této složky imunity řadíme ještě *enkapsulace*, kdy granulocyty a plazmatocyty vytváří více vrstev kolem cizorodého objektu. Jeho výsledkem je nekrotizace celé kapsule. (Akai a Sato, 1973; Pech, 1994; Strand a Pech, 1995; Silva et al., 2002; Osta et al. 2005; Gelbič et al., 2006; Wootton, 2006)

2.3.2 Humorální složky imunity u bezobratlých

Mezi tyto složky řadíme různé látky, které jsou produkovány hemocyty nebo tukovým tělískem (Lowenberger, 2001), jako jsou enzymy-lysozomy, antimikrobiální peptidy, lektiny, lytické proteiny i opsoniny, melanizace (Lowenberger, 2001; Ribeiro et al., 2006; Wootton et al., 2006; Söderhäll et al., 2009). Každý druh hmyzu má svůj vlastní specifický sortiment cytotoxických peptidů a bílkovin, které jednají proti invazi patogenů (Lamberty et al., 1999).

Buněčné i humorální složky spolu úzce souvisí, navzájem se doplňují a ovlivňují.

2.4 Hemocyty

U hmyzu jsou popsány různé druhy hemocytů, avšak ne všechny se objevují u všech druhů. Prozatím nejsou zdaleka tak prozkoumány, jako je tomu u obratlovců. U hmyzu nenalezneme obdobu erytrocytů, kvůli zcela odlišnému transportu kyslíku. Zatím se neobjevily buňky podobné trombocytům. Provedena byla také spousta studií, které srovnávali hemocyty různých druhů mezi sebou i srovnání s lidskými krvinkami. Z nichž vyplývá určitá podobnost mezi hemocyty nalezené u *S. apterus* a lidskými leukocyty. Podle velikosti a morfologické struktury by se hmyzí prohemocyty daly přirovnat k lidským lymfocytům. Granulocyty *S. uterus*, se jeví jako lidské neutrofilní granulocyty. U plazmatocytů se předpokládá, že by mohly mít podobnou funkci jako lidské monocyty. Sfěrulocyty jsou pořád záhadou, nenašla se pro ně jakákoliv podobnost s lidskými krevními buňkami (Berger a Slavíčková, 2008).

2.4.1 Klasifikace hemocytů

U většiny druhů z řádu Lepidoptera rozeznáváme pět druhů hemocytů podle Brehéline a Zachary (1986) a to granulocyty (GR), prohemocyty (PR), plazmatocyty (PL), sfěrulocyty (SF) a eonocyty (EON).

Granulocyty (GR) jsou nejběžnějším typem hemocytů o velikosti 5-8 μm (Ribeiro et al., 2006). Mírně basofilní cytoplazma je silně granulovaná s hrubým endoplazmatickým retikulem, Golgiho aparátem. Přítomny jsou též mitochondrie, glykogenové složky rozptýlené v cytoplazmě a množstvím pinocytotických váčků (Falleiros, 2003; Berger a Slavíčková, 2008). Tyto hemocyty jsou velice variabilní, většinou se však jedná o buňky kulatého nebo oválného tvaru o velikosti 4 - 20 μm . Jádra jsou uložena v centru buňky. V jádru pozorujeme v masách roztroušený chromatin většinou i s jadérkem. Funkcí granulocytů je fagocytóza, která probíhá jak *in vivo*, tak *in vitro*. (Akai a Sato, 1973; Pech et al., 1994; Silva 2002; Costa et al., 2005; Gelbič et al. 2006). Na základě povrchové ultrastruktury by se GR daly zařadit do dvou podtypů, jedny s mnoha a druhé s menším počtem povrchových výčnělků (pseudopodií),

kteře pravděpodobně představují aktivní a neaktivní formu buňky vzhledem k fagocytární aktivitě (Jalali, 2008) Někteří autoři popisují nález hemocytů s rysy GR i PL (Silva et. al., 2002; Falleiros, 2003)

Prohemocyty (PR) jsou velké 3-10 μm , mohou být kulaté, oválné nebo eliptické buňky s velkým, centrálně uloženým jádrem, který téměř vyplňuje celou buňku. V jádru nacházíme dobře viditelné jadérko. Cytoplazma zaujímá jen úzký prostor kolem jádra, obsahuje velké množství volných ribozómů, ale jen velmi malá hrubá endoplazmatická retikula a velmi málo mitochondrií. Vzácně se u PR nalézají i Golgiho komplex (Silva et al., 2002; Falleiros, 2003; Berger a Slavičková, 2008). Často se považují za prekurzory diferencovaných hemocytárních typů (Gupta, 1979; Brehélin et al. 1979; Negreiro et al., 2004; Ribeiro a Brehélin, 2006).

Plasmatomy (PL) jsou protáhlé vřetenovité buňky do velikosti 4 - 25 μm s velkým kulatým jádrem o velikosti 5 - 11 μm jsou bohaté na endoplazmatické retikulum. V jádře můžeme nalézt až dvě masivní jadérka. Cytoplazma je bazofilní mohou být přítomny malé granule nebo dutinky proměnlivých formátů a tvarů, dobře vyvinuté hrubé endoplazmatické retikulum, golgiho komplex i mitochondrie. Často nalezené buňky s charakteristickými znaky jak PR tak i PL se označují jako mladé plasmatomy (Silva 2002; Falleiros 2003; Berger a Slavičková 2008). PL tvoří kolem velkých cizích těles nebo většímu počtu bakterií tzv. kapsule. Indikují tak apoptózu granulocytů (Lavine a Strnad, 2002; Ribeiro a Brehélin, 2006; Lackie, 1983).

Sférulocyty (SP) mají různou velikost, většinou jsou však velkého kulatého či vejčitého tvaru, 22-48 μm veliké. Jádro je oproti velikosti celé buňky malé, uložené uprostřed nebo na okraji buňky. Cytoplazma je basofilní, vzhledem k množství inkluzí zaujímá poměrně malý obsah. Snadno se rozpoznají od ostatních hemocytů podle velkého počtu sférulí, což jsou velké inkluze. Kromě sférulí cytoplazma obsahuje v malém počtu organely umístěné především kolem jádra a to: ribozomy, endoplazmatické retikulum, Golgiho komplex a mitochondrie (Silva 2002; Falleiros 2003; Ribeiro a Brehélin, 2006; Berger a

Slavičková 2008). Jejich funkce ještě není zcela objasněna. Některé studie jim připisují úlohu v transportu, jiné v metamorfóze (Ribeiro a Brehélin, 2006; Sass et.al., 1994).

Oenocyty (OE) jsou popisované jako 22-35,5 μm velké, kulaté buňky s malým jádrem uloženým většinou na okraji buňky. Cytoplazma je homogenní a chudá na organely s výjimkou volných ribozómů (Silva, 2002; Falleiros, 2003; Ribeiro a Brehélin, 2006).

2.4.2 Apoptóza

Je jeden z nejčastějších typů programované buněčné smrti buňky. Ve většině případů jde o fyziologickou buněčnou smrt, která nezpůsobuje zánětlivou reakci, na rozdíl od nekrózy. Hraje rozhodující roli v celé řadě fyziologických procesů a to jak během vývoje plodu, tak i v dospělé tkáni (Reed, 2000). Imunitní systém je na jevu apoptózy zcela závislý, a proto porušení tohoto procesu, má fatální následky. Téměř třetina všech lymfocytů každý den při dozrávání zanikne. Tato selekce je fyziologická (Trebichavský, 1994). Buňka, která podlehně apoptóze se morfologicky mění. Cytoplazma začíná kondenzovat, buňka se zmenšuje, dochází ke sraštění jádra a kondenzaci jadérka a chromatinu, následně se rozpadne chromatin i jádro, vytváří se apoptosomy (apoptotická tělíska), které jsou fagocytovány (Reed, 2000). Apoptózu podporují různé faktory jako například Ca^{2+} , TNF receptor, cytokiny i různé geny. I vnější vlivy, jako je stres, chemoterapie, toxické látky

(Zhang et al. 2005) nebo infekce (bakteriální i virové), jsou také schopné vyvolat apoptózu (Reed, 2000).

2.4.3 Metody rozpoznávání hemocytů

Hemocyty můžeme zkoumat řadou technik. V poslední době se objevuje názor, že nejefektivnějším způsobem je spojení více technik, přičemž se zvýší pravděpodobnost správného zařazení hemocytů i určení jejich funkce.

Základní metodou je světelná mikroskopie. V hematologii je univerzální metodou pro světelnou mikroskopii je Pappenheimovo panoptické barvení. Toto kontrastní barvení je nejběžněji používané na krevní nátěry, protože velmi dobře zobrazuje jádro i cytoplazmu. Tato metoda je základní jak pro lidskou, tak veterinární hematologii.

Další velmi častou metodou je elektronová mikroskopie zejména pak skenovací (SEM). Je možné do jisté míry považovat SEM za analogii světelného mikroskopu v dopadajícím světle, na rozdíl od něho je výsledný obraz tvořen pomocí sekundárního signálu. Velkou předností SEM v porovnání se světelným mikroskopem je jeho velká hloubka ostrosti (Nebesářová). V pozadí nezůstává ani transmisní elektronová mikroskopie (TEM).

Identifikace hmyzích hemocytů pomocí monoklonálních protilátek (mAbs) je zajímavou technikou a přislíbujícím vysokou specifitu. Značení pomocí mAbs je hlavní technikou identifikace buněk imunitního systému u obratlovců (Chain et al., 1992; Rodriguez et al., 1995; Strand a Johnson, 1996; Falleiros, 2003, Winotaphan et al., 2005). Prozatím však ještě nebyly izolované mAbs s dostatečnou specifitou pro dané hemocyty (Ling et al., 2003).

Další metodou rozpoznávání hemocytů je průkaz enzymů například protéza, kyselá fosfatáza, peroxidáza atd. (Chain et al., 1992).

Prokázalo se, že velmi účinnou metodikou je fluorescenční mikroskopie, využívající jako barviva např. akridinovou oranž a propidium jodid (Ling et al., 2003).

Dobrou cestou, zejména pro urychlení identifikace, je průtoková cytometrie (Ribeiro a Brehélin, 2006).

2.5 Koncentrace hemocytů

Ke zjištění koncentrace leukocytů se běžně využívá počítání jednotlivých buněk v Bürkerově komůrce s využitím Türkova roztoku.

Koncentraci určité látky, můžeme měřit na základě pohlcování světla určité vlnové délky, pomocí optických spektroskopických metod jako je fotometrie nebo spektrofotometrie.

Fotometry jsou jednodušší, k vymezení úzkého pásma vlnových délek používají filtry. Lze tedy měřit pouze v takových vlnových délkách, na které máme filtry.

Spektrofotometry používají mřížkový monochromátor a ten umožňuje kontinuálně měnit vlnovou délku měření a to v širokém intervalu (Drbal, Křížek; Schneiderka a kolektiv)

3. CÍLE PRÁCE

- Prostudovat stabilitu základních nepatologických hematologických hodnot u zvoleného alternativního biomodelu v průběhu dne
- Ověřit možnosti ELISA readeru pro zpřesnění odečtu koncentrace hemocytů

4. METODIKA

4.1. Odběr

Vybírali jsme larvy *Spodoptery littoralis* šestého larválního instaru, těsně po svléknutí a ponechali je v termostatu se stálou teplotou 25°C s konstantním střídáním světla a tmy (16 hod. světlo, 8 hod. tma)(Lackie 1983). Kde byly chovány v petriho miskách a krmeny standardní dietou PREMIX (výrobce Stonefly Industries, Bryan, TX, USA). Po 24 hodinovém aklimatizování jsme začali odebírat hemolymfu. Hemolymfa byla odebírána vždy minimálně třem larvám po tří hodinových intervalech během 24 hodin – v 09:00, 12:00, 15:00, 18:00, 21:00, 24:00, 03:00 a 06:00 hodin. Vpich byl proveden pod panožkou, kapku hemolymfy jsme kápili na podložní sklíčko. Pomocí druhého podložního sklíčka tzv. roztěrového jsme zhotovili preparát krevního nátěru, který jsme následně obarvili.

4.2 Panoptické barvení dle Pappenheima

Hemocyty jsme barvili pomocí pappenheimova barvení. Dobře vysušený preparát byl nejprve obarven v roztoku May-Grünwalda (6 minut). Následovalo řádné opláchnutí destilovanou vodou (1 minutu). Dalším krokem bylo dobarvení preparátu roztokem Giemsa-Romanovského a vody (30 minut). Roztok byl vždy připravován těsně před barvením v poměru 1:3 dílům vody. Nakonec byl preparát opláchnut pod proudem tekoucí vody a usušen.

Takto připravený preparát byl vhodný k diferenciálnímu rozpočtu hemocytů (DHC= differential hemocyte count) ve světelném mikroskopu. Rozpočet byl utvářen s minimálně 100 spočítaných buněk.

Fotografická dokumentace byla vytvořena za pomoci CCD kamery na mikroskopu značky OLYMPUS BX 51 s objektivem zvětšující 100x.

4.3 Koncentrace hemocytů

Na tento test byly použity stejné vzorky hemolymfy jako na diferenciální rozpočet. Před měřením jsme si připravili speciální protisrážlivý roztok. A to smícháním NaOH (0,098 M) s NaCl (0,186 M), EDETA (0,017 M) a s kyselinou citronovou (0,041 M) do 100 ml destilované vody. (Mead et al., 1986, cit. Strand, 1996) Následně jsme odpipetovali 90 μ l protisrážlivého roztoku do jamek mikrodestičky přidali jsme k němu 10 μ l hemolymfy a řádně promíchali. Z jednoho vzorku jsme provedli 2 paralelní měření. Vzniklý roztok byl měřen fotometricky za pomoci ELISA readeru (Sunrise, Tecan). Při měření jsme využívali vlnové délky 620 nm.

4.4 Statistické zpracování dat

Výsledky jsou vyjádřeny jako průměrná hodnota skupiny \pm směrodatná odchylka průměru.

5. VÝSLEDKY

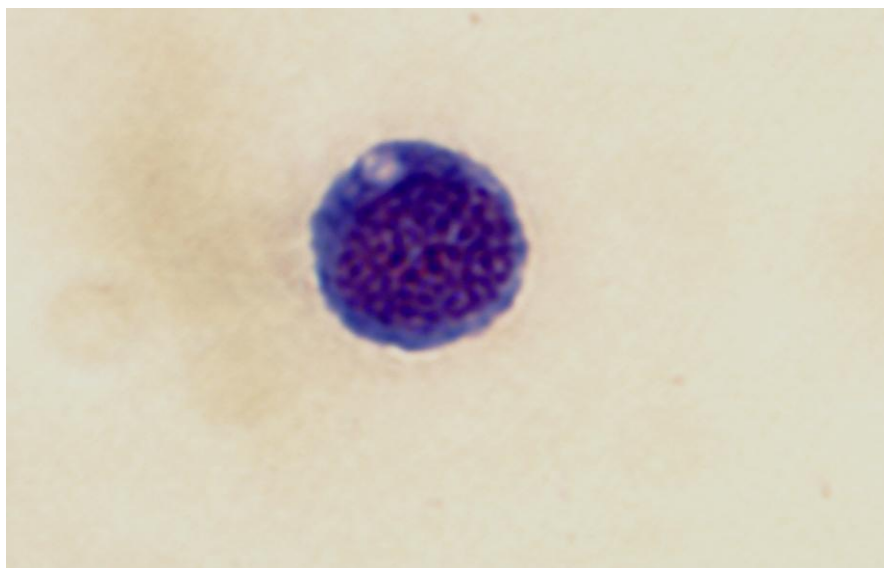
5.1 Morfologie hemocytů

Díky panoptickému barvení jsme pomocí světelného mikroskopu jsme sledovali tyto buňky: granulocyty (GR), prohemocyty (PR), plasmacyty (PL), sférulocyty (SF) i apoptotické buňky.

Morfologie hemocytů byla velice rozmanitá, pozorovali jsme různé varianty jednotlivých buněk s ohledem na jejich tvar, velikost i výsledek barvení.

Granulocyty byly nejčastěji vyskytované hemocyty kulatého tvaru s centrálně uloženým kulatým jádrem. Typické pro GR je tmavě fialovorůžové jádro. Cytoplazma byla granulovaná modrofialová. Mnohdy u GR nebylo možné rozlišit cytoplazmu od jádra, celá buňka byla tmavě fialová až do černa. Pozorovali jsme různou velikost tohoto typu hemocytů, proto jsme se rozhodli pro další rozdělení na malé (mGR) a velké (vGR). GR střední velikosti jsem zařadila mezi vGR.

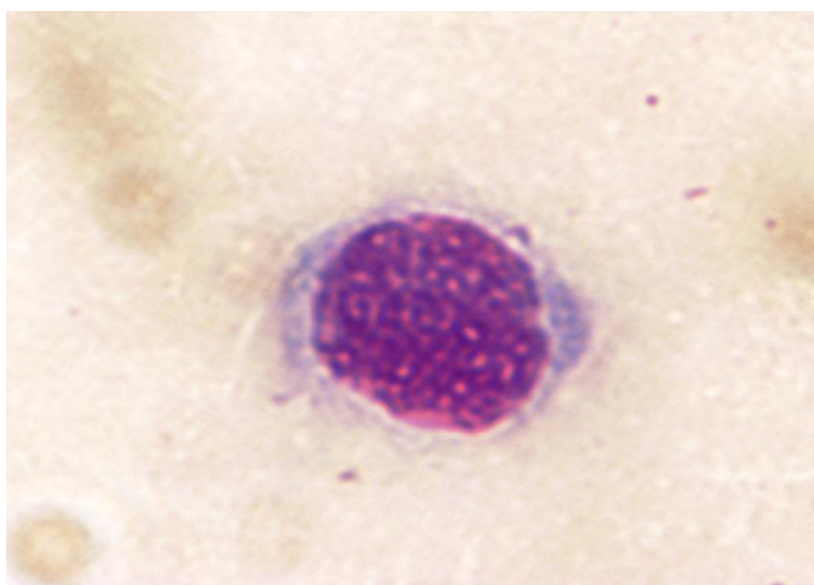
Obr. 1: Granulocyt



zdroj: vlastní výzkum

Pro *prohemocyty* bylo typické růžové jádro, vyplňující téměř celou buňku. Okolo jádra je světlounece fialová cytoplazma, bez granul nebo vakuol. U některých PR byla takřka neviditelná. U PR, stejně jako u výše zmíněných GR, byla velká variabilita ve velikosti. I zde jsme se rozhodli pro další rozdělení na malé (mPR) a velké PR (vPR). Střední velikost jsem zařadila mezi vPR.

Obr. 2: Prohemocyt



zdroj: vlastní výzkum

Plasmatocyty jsme pozorovali většinou jako zploštělé buňky s různě dlouhými výběžky na zploštělých koncích. Jádro bylo kulatého nebo oválného tvaru. Cytoplazma se jevila jako mírně granulovaná. Výsledky barvení nebyly jednoznačné. Někdy připomínaly GR jindy spíše PR.

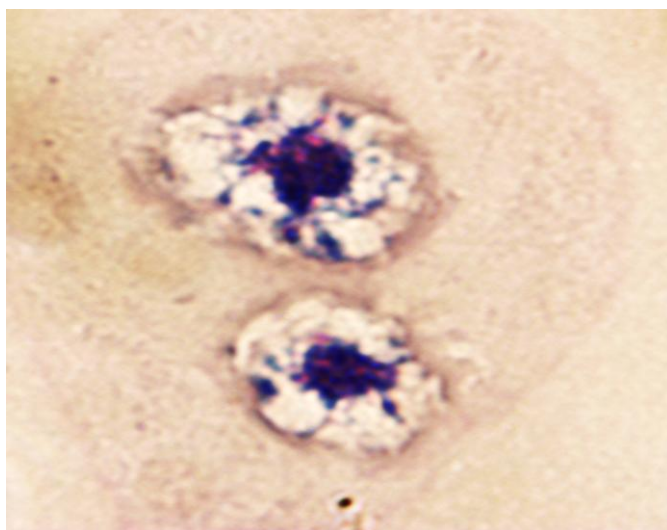
Obr. 3: Plasmatocyt a Granulocyt



zdroj: vlastní výzkum

U *sférulocytů* jsou v cytoplazmě typické inkluze tzv. sférula seskupené kolem jádra, které je nejčastěji uloženo centrálně, pozorovali jsme však i excentrické uložení jádra. V panoptickém barvení byly inkluze bezbarvé, někdy narůžovělé s růžovým hraničením. Inkluze byly počtem i velikostí různorodé. Pozorované jádro bylo malé, bylo menší i ve srovnání s jádry ostatních pozorovaných hemocytů.

Obr. 4: Sférulocyt

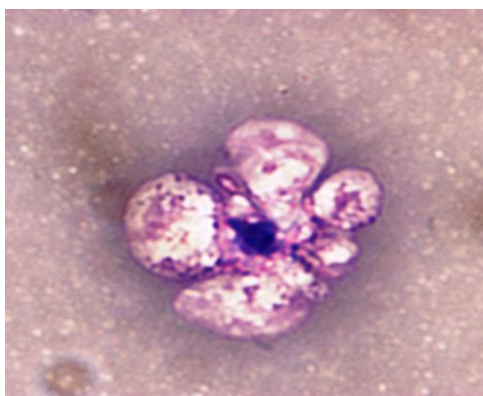


zdroj: vlastní výzkum

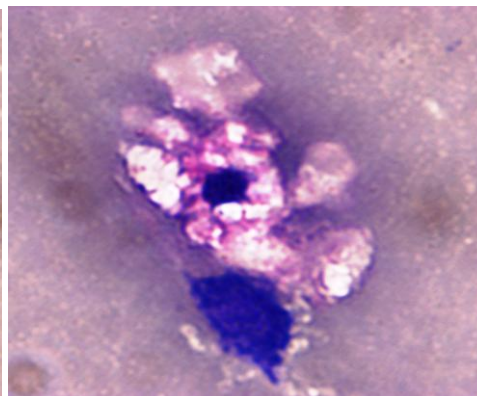
Panoptické barvení nám umožnilo sledovat apoptózu, dobře viditelná byla segmentace buňky i apoptotická tělíska. Počet apoptotických buněk nebyl vysoký u některých vzorků, jsem dokonce nepozorovala ani jednu.

Obr. 5 a); b) Apoptóza

a)



b)



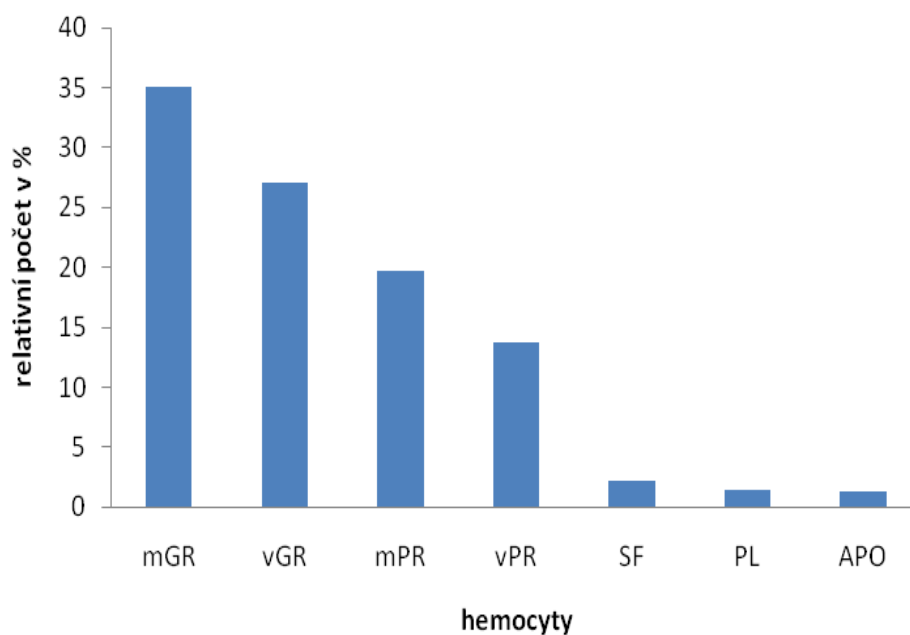
zdroj: vlastní výzkum

5.2 Zastoupení jednotlivých hemocytů

Pomocí četností jednotlivých hemocytů v pozorovaných nátěrech jsme zjistili, že nejvíce jsou v hemolymfě *S. littoralis* zastoupeny mGR

(35,1% ± 2,6%), následují vGR (27,1% ± 4,5%), mPR (19,7% ± 3,4), vPR (13,7% ± 2,4%), SF (2,2% ± 1,8%), PL (1,4% ± 0,8%) a s nejnižším zastoupením se vyskytovala apoptóza (1,2% ± 2%). Celkové zastoupení granulocytů je 62,2% ± 5,5% a prohemocytů 33,4% ± 4,2%.

Graf 1: Zastoupení jednotlivých hemocytů v %.



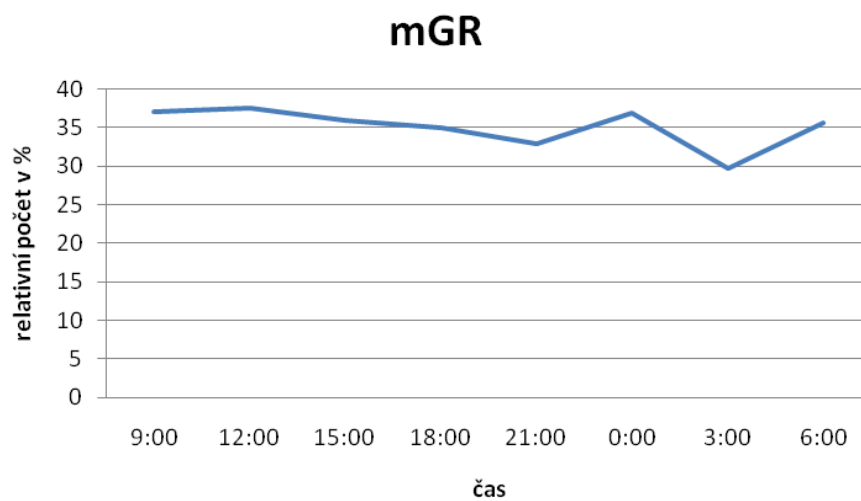
zdroj: vlastní výzkum

5.3 Diferenciální rozpočet hemocytů (DHC)

Úkolem této práce bylo prostudovat stabilitu základních nepatologických hematologických hodnot u zvoleného alternativního biomodelu v průběhu dne pomocí DHC.

Z našich výsledků je patrné, že počet jednotlivých hemocytů není stabilní, v průběhu dne se počty mění. Až na mGR a PL, u kterých je počet v průběhu dne téměř stálý, nedochází k výrazným změnám.

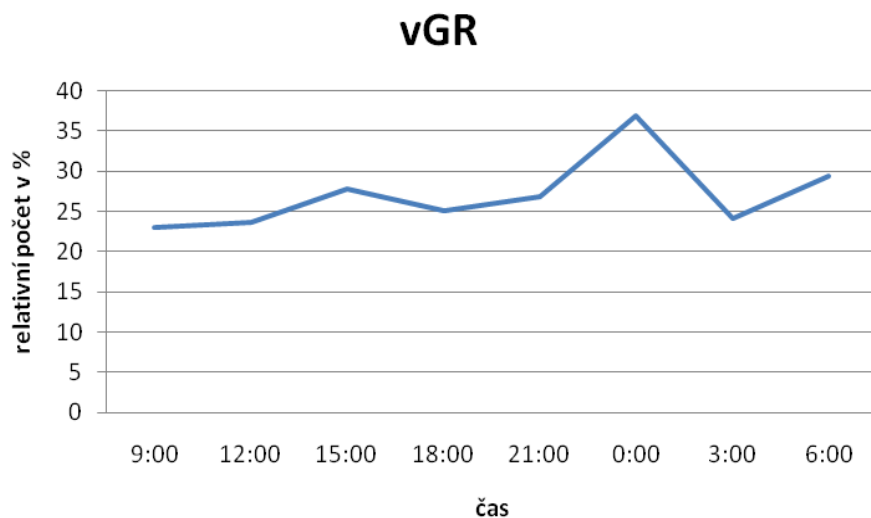
Graf 2: diferenciální rozpočet malých granulocytů v průběhu 24 hodin.



zdroj: vlastní výzkum

U vGR už můžeme pozorovat nárůst kolem půlnoci, na 36,9% z celkového počtu pozorovaných buněk, který se kolem 03:00 opět stabilizuje.

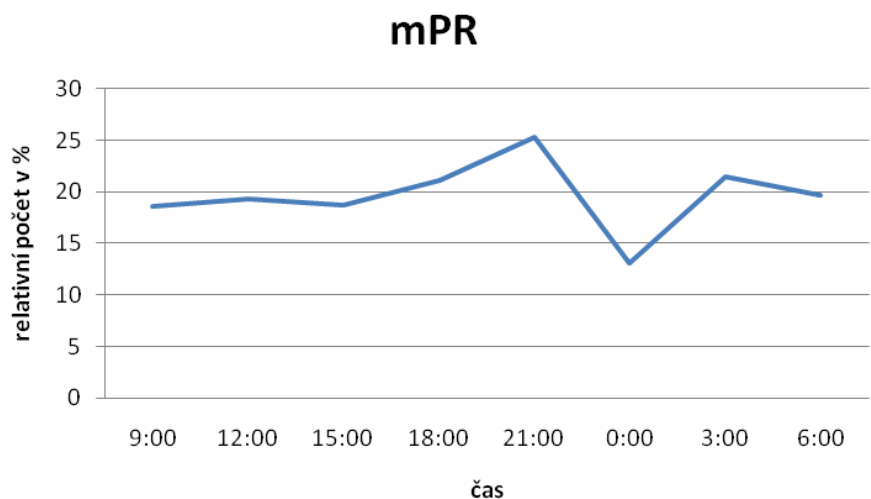
Graf 3: diferenciální rozpočet velkých granulocytů v průběhu 24 hodin.



zdroj: vlastní výzkum

Počet mPR dosahuje maxima ve 21:00, následuje prudký úbytek o půlnoci, kdy je relativní počet mPR 13%.

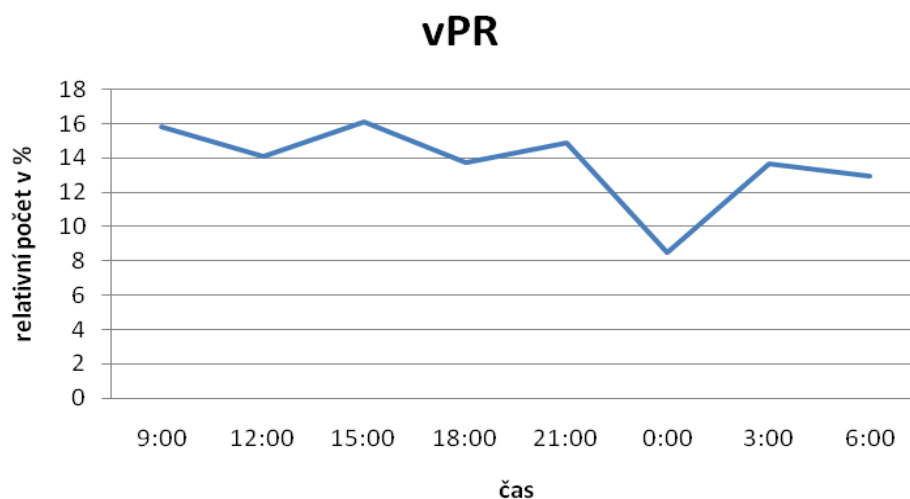
Graf 4: diferenciální rozpočet malých prohemocytů v průběhu 24 hodin.



zdroj: vlastní výzkum

Podobně jako u mPR jsme sledovali kolem půlnoci nejnižší počet vPR a to 8,5%. A maxima dosahují v 15:00. S nepatrnými výkyvy je počet mPR stálý.

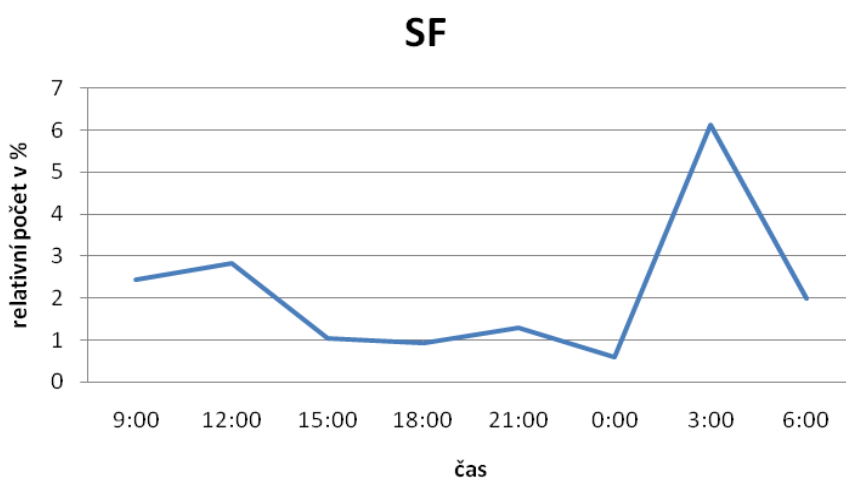
Graf 5: diferenciální rozpočet velkých prohemocytů v průběhu 24 hodin.



zdroj: vlastní výzkum

Ve 03:00 jsme pozorovali nárůst SF na 6,1%. Naopak nejméně SF je ve 00:00 a to 0,6%.

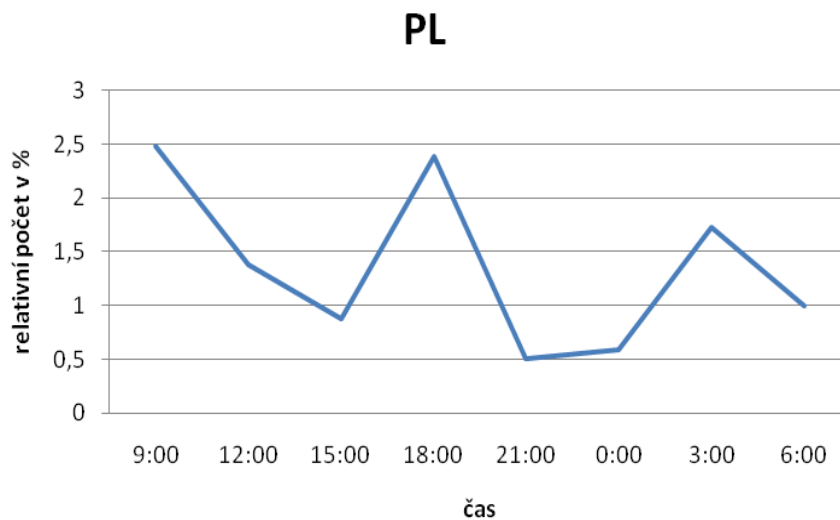
Graf 6: diferenciální rozpočet sférolucytů v průběhu 24 hodin.



zdroj: vlastní výzkum

Plasmatocytů jsem pozorovala velice málo s malými změnami v průběhu dne. Maximální počet jsem pozorovala v 9:00 a to s hodnotou 2,49%, nejnižší počet byl ve 21:00 a hodnotou 0,5%.

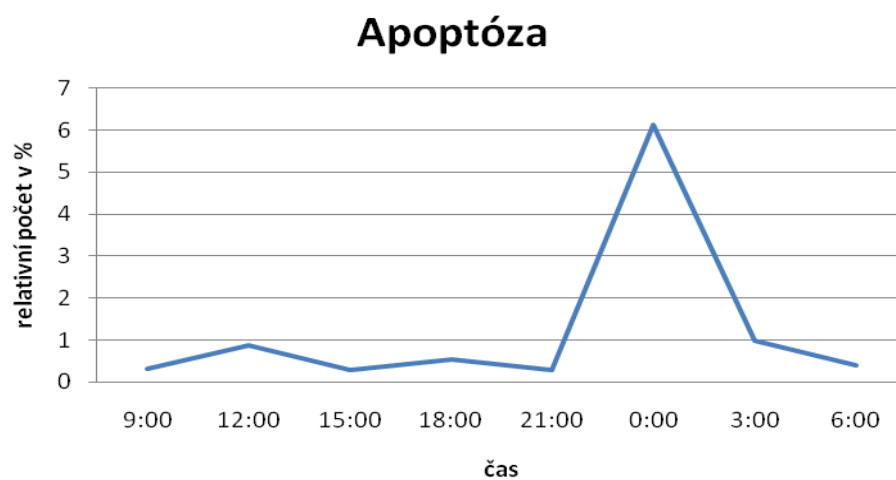
Graf 7: diferenciální rozpočet plasmatocytů v průběhu 24 hodin.



zdroj: vlastní výzkum

Velice zajímavý je relativní počet apoptózy v průběhu dne. Kolem půlnoci byl výrazný nárůst a to na 6,2 % přičemž v jiných hodinách apoptóza nedosáhla ani na 1% z celkového počtu pozorovaných hemocytů.

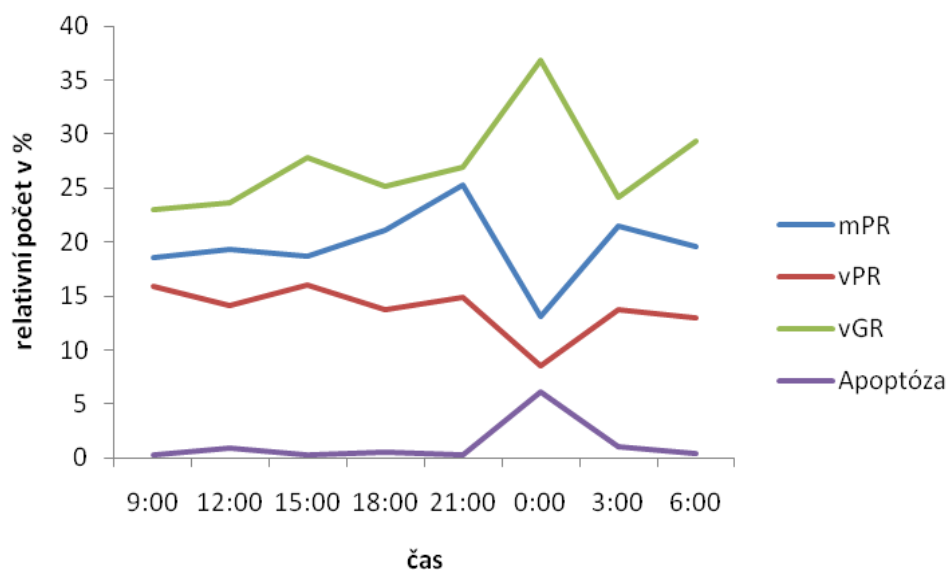
Graf 8: diferenciální rozpočet apoptózy v průběhu 24 hodin.



zdroj: vlastní výzkum

Když srovnáme apoptózu s prohemocyty (mPR i vPR) a velkými granulocyty, s největší pravděpodobností spolu úzce souvisí. Jak je vidět na grafu č.9. Když v 0:00 klesá počet mPR i vPR, vzrůstá počet vGR a také počet pozorovaných apoptotických buněk. S největší pravděpodobností v této době dochází k apoptóze právě prohemocytů.

Graf 9: Srovnání mPR, vPR, vGR a apoptózy



zdroj: vlastní výzkum

5.4 Koncentrace hemocytů

Na ELISA readru jsme využili pro měření vlnovou délku 620 nm. Měření bylo prováděno proti blenku (destilovaná voda). Z tabulky č.1, kde uvádíme výsledky z prvního měření, je patrné, že koncentrace je velmi rozmanitá. Od 2,13 mmol/l až po 29,16 mmol/l s průměrnou směrodatnou odchylkou 7,44. Podobně jsou na tom i výsledky u ostatních měření (viz. Přílohy). U měření č.2 jsou výsledné koncentrace od 2,08 – 31,89 mmol/l s průměrnou směrodatnou odchylkou 7,89 (Příloha 1). Měření č.3 koncentrace se pohybují v rozmezí 2,34 – 33,68, směrodatná odchylka je 7,74 (Příloha 2). A u posledního měření č. 4 se koncentrace pohybují od 2,21 do 32,84 mmol/l s nejnižší směrodatnou odchylkou 7,24 (Příloha 3).

Tabulka 1: Měření č. 1. Měření koncentrace hemocytů na ELISA readru při vlnové délce 620 nm. Výsledky jsou uvedeny v mmol/l.

Čas	Číslo vzorku	c (mmol/l)		směrodatná odchylka
		a)	b)	
9:00	1.	3,47	6,13	1,880904038
	2.	5,06	14,69	6,809438303
	3.	3,87	14,85	7,764032457
12:00	4.	7,24	20,32	9,248956698
	5.	5,54	20,74	10,74802307
	6.	5,84	29,16	16,48973014
15:00	7.	4,98	13,18	5,798275606
	8.	6,16	12,94	4,794183976
	9.	7,16	14,88	5,458864351
18:00	10.	7,76	23,51	11,1369318
	11.	3,73	21,22	12,3672976
	12.	6,87	11,22	3,075914498
21:00	13.	3,42	12,96	6,745798693
	14.	3,13	14,25	7,863027407
	15.	5,07	16,91	8,372144289
0:00	16.	2,31	5,51	2,2627417
	17.	8,49	15,53	4,97803174
	18.	10,49	10,49	0
3:00	19.	3,51	4,1	0,417193001
	20.	2,35	11,22	6,272037149
	21.	3,55	22,27	13,23703894
6:00	22.	7,6	30,5	16,19274529
	23.	17,38	27,02	6,816509371
	24.	9,85	12,67	1,994041123

zdroj: vlastní výzkum

6. DISKUZE

Vycházeli jsme z klasifikace podle Brehéline a Zachary (1986), kteří popsali tyto hemocyty: granulocyty (GR), prohemocyty (PR), plasmacyty (PL), sférolocyty (SF) a eonocyty (EON). EON u *S.littoralis* in vitro během 3 minut lyzují a mizí (Lavine a Strand 2002; Costa et. al. 2005; Ribeiro a Brehélin 2006). Proto nebylo možné, abychom je ve vzorcích pozorovali.

Byly pozorovány i jiné typy hemocytů, například Jallali et al. (2008) pozorovali ještě adipocyty, vermicyty a podocyty. Kde adipocyty popisují jako vejčité podlouhlé buňky, jejichž velikost se pohybuje v rozmezí 5,5-10 μm s centrálně uloženým jádrem a hladkou buněčnou membránou. Naopak Sanjayan et al. (1996) nazývají adipocyty jako adipohematocyty (typický příklad nesjednocené nomenklatury). Podle něj jsou Adipohematocyty velikostně velmi variabilní, kulatého nebo oválného tvaru. Porovnává je s PL, tvrdí, že adipohematocyty mají oproti PL menší jádro, oválnějšího tvaru většinou uložené excentricky. A cytoplazma obsahuje malé tukové kapénky a vakuoly. Silva et al. (2002) pozorují adipohematocyty velikostně i tvarově vysoce polymorfni s basofilní membránou. Často sledují inkluze, které překrývají jádro. Jediné na čem se tyto výzkumné týmy shodují je tvar buňky, nutno podotknout, že využívali různé techniky zobrazování. Sanjayan et al. (1996) využívali panoptického barvení a zobrazovací technikou jim byla světelná mikroskopie. Zatím co Jallali et al. (2008) využili SEM. A Silva et al. (2002) použili k detekci Giemsa-Rosenfeldovo barvení. Z tohoto příkladu vidíme, že by bylo vhodné spojit více technik pro získání popisu hemocytů a tím přesnějšího zařazení. Tyto popisy by mohly poukazovat též na PL, pravděpodobně na nějakou nevyzrálou nebo neaktivní formu PL. Stálo by také za zamyšlení, zda-li se PL nevyskytují ve více formách a tudíž by bylo vhodné je mezi sebou rozřadit. Jalali et al. (2008) tvrdí, že PL se vyskytují v 6 různých variantách s ohledem na jejich tvar. Dalšími buňkami připomínající PL jsou vermicyty, které jsou vřetenovitého tvaru s jádrem lokalizovaným ve středu buňky. S hladkou buněčnou membránou (Falleiros et al., 2003). Tento popis

nápadně připomíná popis adipocytů podle Jalali et al. (2008). Mohlo by se tudíž jednat o stejné hemocyty, ale jinak pojmenované. Podocyty popisují Falleiros et al. (2003) jako ploché buňky s větším počtem výběžků. Jádro je veliké, lokalizované centrálně. I tyto hemocyty bychom mohli řadit mezi PL. Pozorovali jsme podobné buňky, které byly morfologicky shodné s PL jen měly více výběžků. Jak je vidět klasifikace hmyzích hemocytů není standardizovaná, byly pozorovány různé druhy hemocytů, ale ne všechny subpopulace jsou vždy přítomny u všech druhů hmyzu (Gupta 1979). Ať tak či onak, přesné třídění je důležitý předpoklad pro další studium hemocytů.

Rozhodli jsme se pro identifikaci použít světelnou mikroskopii, která je běžná jak pro humánní, tak i veterinární praxi, i když jak uvádí Arnold (1979) je tato metoda zdrojem časté polemiky. Při identifikaci každého typu hemocytů světelnou mikroskopii často dochází k chybám. Je to totiž velice subjektivní záležitost, každý z nás má přeci jen jiné oko. Falleiros et al. (2003) popisují, že je zvláště obtížné od sebe odlišit GR a PR a to i pro zkušené výzkumníky. Použili jsme panoptické barvení, které je stejně jako světelná mikroskopie, běžně používané v humánní i veterinární praxi. Toto barvení má výhodu v tom, že se dá různě upravit tak, aby výsledkem barvení byly dobře pozorovatelné struktury buněk v různých odstínech fialové a růžové. Další výhoda spočívá v tom, že nevyžaduje fixaci hemolymfy, protože je zároveň i fixačním prostředkem. Ačkoliv barvení podle Pappenheima, nám umožnilo dobře od sebe rozeznávat jednotlivé hemocyty, je pravdou, že některé preparáty, se obarvily více, tzv. se přebarvily. V takovýchto preparátech bylo obtížné mezi sebou rozeznat PR a GR. Také jsem nemohla rozpoznat kulatý typ PL, pravděpodobně jsem je zařadila mezi GR nebo PR. To je možná důvod proč jsme pozorovali jejich celkové zastoupení jen 1,4% oproti Falleiros et al. (2003) kteří pozorovali 29% zastoupení, Gelbič et al. (2006) udávají že z celkového počtu hemocytů jsou PL zastoupeny 60-80% a Jalali et. al (2008) 37,8% zastoupení v 5. instaru. Ani zastoupení ostatních typů hemocytů se příliš neshoduje s výsledky naší práce. Gelbič et al. (2006) uvádí v 6. instaru procentuelní

zastoupení takto: GR 5-25%, SF 8-16% a eonocyty 1,5-2,6%. PR v této práci nebyly pozorovány. Jalali et. al (2008) pozorovali 40% zastoupení PR, u ostatních hemocytů zastoupení neuvádí. Falleiros et al. (2003) eonocyty 5,3%, vermicyty 9,3%, SF zhruba třetinové zastoupení z celkového počtu. GR pozorovali jako nejčastěji se vyskytující hemocyty. V práci Brillarda et al. (2001) kde uvádí počet PL a GR dohromady tvoří 90%, SF 5%, PR také 5% a malé množství tvoří eonocyty a velké granulocyty. Jen s Falleiros et al. (2003) jsme se shodli, že GR jsou nejpočetnější skupinou hemocytů.

Doposud nebyla vypracovaná práce zaměřující se na biorytmy hemocytů *S. littoralis* (Boisd.). Mohli bychom však navázat na názor, že by se hemocyty *S. apterus* mohli přirovnat k lidským hemocytům (Berger a Slavíčková 2008). Maximální počet GR dosahoval v naší práci v 0:00 a odpoledne. GR by se dali přirovnat k lidským neutrofilům, které dosahují maxima kolem poledne a před půlnocí (Palm et al., 1996 Akbulut et al., 1999), což by souhlasilo i s našimi výsledky. I proto bych se také přikláběla k názoru, že by se GR mohli přirovnat k neutrofilům. Monocyty mají maximum odpoledne a večer (Akbulut et al., 1999), tyto buňky přirovnává Berger a Slavíčková k PL. Protože jsme sledovali jen malé procento PL (v maximu pouze 2,5%), netroufáme si je srovnávat. Abychom však opravdu potvrdili domněnky, že by se hemocyty hmyzu dali přirovnat k lidským leukocytům. Měli bychom provést další testy, přikláběli bychom se identifikaci pomocí monoklonálních protilátek (mAb), zatím však nebyly vytvořeny specifické mAb proti daným hemocytům (Chain et al., 1992; Rodriguez et al., 1995; Strand a Johnson, 1996; Falleiros, 2003; Ling et al., 2003), to bych v tomto případě neviděla jako tak veliký problém. Stačilo by zkusit použít mAb namířené proti lidským leukocytům, které již známe a aplikovat je na hmyzí hemocyty, tím bychom mohli podobnost s leukocyty potvrdit a dokonce bychom mohli přiřadit jednotlivé typy hemocytů k jednotlivým typům lidských leukocytů.

Ani odborná práce zabývající se apoptózou s ohledem na cirkadiánní rytmy prozatím nebyla sepsána. Z výsledků této práce vyplývá určitá spojitost

mezi PR a apoptózou. Pozorované apoptotické buňky se morfologicky podobali PR. Kolem pŕlnoci jsme pozorovali zvýšení GR, to by mohlo také souviset s apoptózou. GR jsou schopné fagocytózy (Costa et al., 2005), pravděpodobně proto kolem pŕlnoci dosahují maxima, protože pohlcují apoptotické buňky. Je ovšem možné, že jsme mohli některé apoptotické buňky zaměnit za SF. A to pokud byl preparát přebarvený, nebo pokud jsme nedostatečně opláchli obarvený preparát, pak mohly částčky barviva ulpět na preparátu a pod mikroskopem pak se inkluze SF mohly jevit jako apoptotická tělíška. Myslím, že by bylo velice zajímavé pokračovat ve studiu apoptózy v závislosti na čase. Pro takovýto výzkum, by se apoptóza měla potvrdit více metodami. Například pomocí elektronového mikroskopu, dále metodou TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labelling, TUNEL assay) díky které se označí buňky na začátku a ve střední fázi apoptózy. Nevýhodou je, že detekuje i nekrotické buňky (Khanobdee et al., 2002). Možná by bylo také vhodné udělat detekci kaspáz.

Vzhledem k velkým rozdílům koncentrace, si myslím, že měření koncentrace pomocí ELISA readeru není příliš vhodné. Podle našich výsledků jsme pravděpodobně měřili koncentraci roztoku hemolymfy a protisrážlivého činidla. Vzhledem k tomu, že jsme měření prováděli u každého vzorku hemolymfy dvojmo, zjistili jsme, že druhé výsledky byly vždy vyšší. S největší pravděpodobností to poukazuje na melanizaci hemolymfy, ke které patrně docházelo při časové prodlevě (než jsme odpipetovali hemolymfu z podložního sklíčka do protisrážlivého činidla v mikrodestičce). Melanizace je důležitou složkou imunitního systému bezobratlých, je životně důležitá pro obranu a stejně tak i pro hojení ran. U většiny bezobratlých je syntéza melaninu dosažena prophenoxidázové aktivaci systému proteolytických kaskád (Söderhäll et al., 2009).

7. ZÁVĚR

I. Díky metodě Pappenheimova barvení, jsme prostudovali základní nepatologické hodnoty v průběhu dne u alternativního biomodelu *S. littoralis* (Boisd.). Zjistili jsme, že se procentuální zastoupení jednotlivých hemocytů podléhá cirkadiánním rytmům. Doporučujeme však její doplnění o nějaký citlivější test pro lepší rozlišení PL a doplnění dalších testů potvrzující výskyt apoptózy.

II. Využití ELISA readeru pro zpřesnění odečtu koncentrace hemocytů, se prokázala jako nevhodná. Snad jen kdyby se doplnila o nějaké vhodné barvení hemocytů před fotometrickým měřením.

8. LITERATURA

1. **Akai, H, Sato, S.:** An ultrastructural study of the haemopoietic organs of the silkworm, *Bombyx mori*. *J Insect Physiol*, 17:1665– 1676. 1973.
2. **Akbulut H., F. Icli, A. Buyukcelik, K.G. Akbulut, Demirci S.:** The role of granulocyte-macrophage-colony stimulating factor, cortisol, and melatonin in the regulation of the circadian rhythms of peripheral blood cells in healthy volunteers and patients with breast cancer. *Journal Pineal*, 26: 1-8, 1999.
3. **Berger J., Slavičková K.:** Morphological Characterization of Hemocytes in the Adult Linden Bug, *Pyrrhocoris apterus* (L.) (Heteroptera *Zoological Studies* 47(4): 466-472, 2008.
4. **Berger J.:** Current progress in chronohaematology. *J. Appl. Biomed.* 4: 111–114, 2006.
5. **Berger J.:** Ethical conflicts of interest in modern biomedicine. *J. Appl. Biomed.* 1: 181–182, 2003.
6. **Berger J.:** Current ethical problems in cell biology. *J. Appl. Biomed.* 3: 109–113, 2005.
7. **Berger J.:** Chronohaematology. *J. Appl. Biomed.* 2 :179–185, 2004.
8. **Bradshaw R. H.:** The ethical review process in the UK and Australia: The Australian experience of improved dialogue and communication. *Animal Welfare.* 11: 141–156, 2002.

9. **Brehélin M., Zachary D., Hoffmann J. A.:** A Comparative Ultrastructural Study of Blood Cells from Nine Insect Orders, *Cell Tiss. Res.* 195, 45-57, 1978.
10. **Brehélin, M.; Zachary, D.:** Insect haemocytes: a new classification to rule out the controversy. *Immunity in invertebrates: cells, molecules, and defense reactions.* Berlin, Germany: Springer-Verlag; s.36–48, 1986.
11. **Brillard, J., Ribeiro, C., Boemare, N. et al.:** Two Distinct Hemolytic Activities in *Xenorhabdus nematophila* Are Active against Immunocompetent Insect Cells. *Appl Environ Microbiol.*, 67(6):2515-2525, 2001.
12. **Cajochen C., Krauchi K., Wirz-Justice A.:** Role of Melatonin in the Regulation of Human Circadian Rhythms and Sleep. *Journal of Neuroendocrinology*, 15: 432–437, 2003.
13. **Costa, S.C.P., Ribeiro, C., Girard, P.-A. et al.:** Modes of phagocytosis of Gram-positive and Gramnegative bacteria by *Spodoptera littoralis* granular haemocytes. *J. Insect Physiol.* 51: 39–46, 2005.
14. **Drbal K., Křížek M.:** Analytická chemie. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, 1. vydání: 105-107, 1999.
15. **Falleiros A. M. F., Bombonato M. T. S., Gregório E. A.:** Ultrastructural and quantitative studies of hemocytes in the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 46 (2), 2003.

16. **Fučíková T., Bartůňková J., Litzman J., Panzner P.:** Základy klinické imunologie. RDI PRESS a Agentura KRIGL, Praha, 10-16, 1994.
17. **Gelbič, I., Strbáčková, Berger, J.:** Influence of Metyrapone on the Morphology of Hemocytes of the Egyptian Cotton Leafworm *Spodoptera littoralis* (Boisd.). *Zool. Studies*, 45(3): 371-377, 2006
18. **Gupta, A. P.:** Hemocyte types: their structure, synonymies, interrelationships, and taxonomic significance. *Insect hemocytes*. New York: Cambridge University, str. 85-127, 1979.
19. **Halberg F., Cornélissen G., Katinas G., Tvildiani L., Gigolashvili M., Janashia K., Toba T., Revilla M., Regal P., Sothorn R. B., Wendt H. W., Wang Z., Zeman M., Jozsa R., Singh R. B., Mitsutake G., Chibisov S. M., Lee J., Holley D., Holte J. E. et al.:** Chronobiology's progress. Part I, season's appreciations 2004–2005: time-, frequency-, phase-, variable-, individual-, age- and site-specific chronomics. *J. Appl. Biomed.*, 4: 1–38, 2006.
20. **Halberg F.:** Chronobiology. *Annu. Rev. Physiol.*, 31:675–725, 1969.
21. **Helfrich-Förster C.:** Organization of endogenous clocks in insects. *Biochemical Society Transactions*. 33: 957-961, 2005.
22. **Helfrich-Förster C.:** The circadian clock in the brain: a structural and functional comparison between mammals and insects *Journal of Comp. Physiol.* 190: 601–613, 2004.
23. **Chain B. M., Leyshon-Sorland K., Siva-Jothy M. T.:** Haemocyte heterogeneity in the cockroach *Periplaneta americana* analysed using monoclonal antibodies *Journal of Cell Science*, 103: 1261-1267, 1992.

24. **Jalali, J., Salahi, R.:** The hemocyte types, differential and total count in *Papilio demoleus* L. (Lepidoptera: Papilionidae) during post-embryonic development. *Munis, Entomology et Zoology* 3 (1): 199-216, 2008.
25. **Karsch F. J., Robinson J. E., Woodfill C. J. I., Brown M. B.:** Circannual Cycles of Luteinizing Hormone and Prolactin Secretion in Ewes during Prolonged Exposure to a Fixed Photoperiod: Evidence for an Endogenous Reproductive Rhythm. *Biology of reproduction*, 41: 1034-1046, 1989.
26. **Khanobdee K., Soowannayan Ch., Flegel T. W., Ubol S., Withyachumnarnkul B.:** Evidence for apoptosis correlated with mortality in the giant black tiger shrimp *Penaeus monodon* infected with yellow head virus. *Disseases of aquatic organisms*, 48: 79–90, 2002.
27. **Klerman E. B.:** Clinical Aspects of Human Circadian Rhythms. *Journal of biological rhythms*, 20 (4): 375-386, 2005.
28. **Knapp M. S., Pownall R.:** Lymphocytes are rhythmic: is this important? *British Medical Journal*. 289: 1328- 1330, 1984.
29. **Lackie A. M.:** Effect of substratum wettability and charge on adhesion in vitro and encapsulation in vivo by insect haemocytes. *Journal of Cell Sci.* 63: 181-190, 1983.
30. **Lamberty, M., Ades, S., Uttenweiler-Joseph, S., Brookhart, G., Bushey, D., Hoffmann, J.A., Bulet, P.:** 1999. Isolation from the lepidopteran *Heliothis virescens* of a novel insect defensin with potent antifungal activity. *J. Biol. Chem.* 274: 9320-9326, 1999.

31. **Lavine M. D., Strand M. R.:** Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32: 1295-1309, 2002.
32. **Levine M. S., Cepeda C., Hickey M. A., Fleming S. M., Chesselet M. F.:** Genetic mouse models of Huntingtons and Parkinsons diseases: illuminating but imperfect. *Trends Neurosci.* 27: 691–697, 2004.
33. **Ling E., Shirai K., Kanekatsu R., Kiguchi K.:** Classification of larval circulating hemocytes of the silkworm, *Bombyx mori*, by acridine orange and propidium iodide staining. *Histochem. Cell Biol.* 120:505–511, 2003.
34. **Lowenberger C.:** Innate immune response of *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31: 219–229, 2001.
35. **Nebesářová J.:** Elektronová mikroskopie pro biology [online], <http://www.paru.cas.cz/lem/book/Podkap/7.0.html> [cit. 23.1. 2009].
36. **Negreiro M. C., Andrade F. G., Falleiros A. M. F.:** Immunology defense system in insects: an approach in velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), AgMNPV-resistant. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, 25 (4): 293-308: 2004.
37. **Osta M. A., Christophides G. K., Vlachou D., Kafatos F. C.:** Innate immunity in the malaria vector *Anopheles gambiae*: comparative and functional genomics. *Journal of Experimental Biology* 207: 2551-2563, 2004.
38. **Paixão R.L., Schramm F.R.:** Ethics and animal experimentation: what is debated? *Cad. Saúde Pública* vol.15 suppl.1 Rio de Janeiro 1999.

39. **Palm S., Postler E., Hinrichsen H., Maier H., Zabel P., Kirch W.:** Twenty-four-hour analysis of lymphocyte subpopulations and cytokines in healthy subjects. *Chronobiol. Int.*, 13: 423-434, 1996.
40. **Pech L. L., Trudeau D., Strand M. R.:** Effects of Basement Membranes on the Behavior of Hemocytes from *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera; Noctuidae): Development of an In Vitro Encapsulation Assay. *Journal of Insect Physiol.*, 41(9): 801-807, 1995.
41. **Pech L. L., Trudeau D., Strand M. R.:** Separation and behavior in vitro of hemocytes from the moth, *Pseudoplusia includens*. *Cell Tissue Res.*, 277:159-167, 1994.
42. **Reed J. C.:** Mechanisms of Apoptosis. *American Journal of Pathology*, 157, (5): 1415-1430, 2000.
43. **Ribeiro C, Brehélin M.:** Insect haemocytes: What type of cell is that? *Journal of Insect Physiol.* 52: 417-429. 2006.
44. **Rodriguez J., Boulo V., Mialhe E., Bachere E.:** Characterisation of shrimp haemocytes and plasma components by monoclonal antibodies. *J. of Cell Science* 108, 1043-1050, 1995.
45. **Sass, M., Kiss, A., Locke, M.:** Integument and hemocyte peptides. *J. Insect Physiol.*, 40: 407–421, 1994.
46. **Schneiderka P. a kolektiv:** Kapitoly z klinické biochemie. Univerzita Karlova v Praze, Karolinum, 2. doplněné a přepracované vydání: 336-343, 2004.

47. **Silva J. E. B., Boleli I. C., Simoes Z. L. P.:** Hemocyte types and total and differential counts in unparasitized and parasitized *Anastrepha obliqua* (Diptera, tephritidae) larvae. *Brazilian Journal of Biology*, 62 (4), 2002.
48. **Söderhäll I., Wu Ch., Novotný M., Lee B. L., Söderhäll K.:** A novel protein acts as a negative regulator of proPO activation and melanization in the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *The Journal of Biological Chemistry*. 284: 6301-6310, 2009.
49. **Strand M. E., Johnson J. A.:** Characterization of Monoclonal Antibodies to Hemocytes of *Pseudoplusia includens*. *Journal Insect Physiol.*, 42 (1): 21-31, 1996.
50. **Trebichavský I.:** Buněčná smrt podle plánu. *Vesmír*, 73: 550, 1994.
51. **Winotaphan P., Sithigorngul P., Muenpol O., Longyant S., Rukpratanporn S., Chaivisuthangkura P., Sithigorngul W., Petsom A., Menasveta P.:** Monoclonal antibodies specific to haemocytes of black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Fish & Shellfish Immunology*, 18: 189-198, 2005.
52. **Wootton E. C., Dyrynda E. A., Ratcliffe N. A.:** Interaction between non-specific electrostatic forces and humoral factors in haemocyte attachment and encapsulation in the edible cockle, *Cerastoderma edule*. *Journal of Experimental Biology*, 209: 1326-1335, 2006.
53. **Zhang P., Yang K., Dai X., Pang Y., Deming Su:** Infection of wild-type *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus induces in vivo apoptosis of *Spodoptera litura* larva. *Journal of General Virology*, 83: 3003-3011, 2002.

9. Klíčová slova:

Apoptóza

Diferenciální rozpočet hemocytů (DHC)

Hemocyty

Koncentrace hemocytů

Pappenheimovo barvení

Spodoptera littoralis (Boisd.)

Key words:

Apoptosis

Differential hemocyte count (DHC)

Hemocytes

Concentration hemocytes

Pappenheim staining

Spodoptera littoralis (Boisd.)

10. PŘÍLOHY

Příloha 1: Měření č. 2. Tabulka naměřené koncentrace hemocytů na ELISA readru při vlnové délce 620 nm. Výsledky jsou uvedeny v mmol/l.

Čas	Číslo vzorku	c (mmol/l)		směrodatná odchylka
		a)	b)	
9:00	1.	3,51	21,34	25,21542782
	2.	3,13	10,53	10,46518036
12:00	3.	4,26	6,21	2,757716447
	4.	2,98	12,03	12,79863274
	5.	4,48	7,8	4,695189027
15:00	6.	3,63	3,89	8,20950973
	7.	2,08	5,49	7,2054181
	8.	7,12	7,23	5,536646097
18:00	9.	5,25	28,22	16,24224276
	10.	12,65	26,31	9,659078631
	11.	4,3	15,6	7,990306627
21:00	12.	8,29	16,92	6,102331522
	13.	6,87	13,4	4,617407281
0:00	14.	7,59	7,58	0,007071068
	15.	4,3	29,23	17,62817205
3:00	16.	5,92	31,89	18,36356311
	17.	2,35	10,4	5,692209589
	18.	9,32	11,5	1,541492783
6:00	19.	5,06	5,05	0,007071068
	20.	2,35	9,47	5,034600282
	21.	8,49	23,17	10,38032755

zdroj: vlastní výzkum

Příloha 2: Měření č. 3. Tabulka naměřené koncentrace hemocytů na ELISA readru při vlnové délce 620 nm. Výsledky jsou uvedeny v mmol/l.

Čas	Číslo vzorku	c (mmol/l)		směrodatná odchylka
		a)	b)	
9:00	1.	6,98	11,36	3,097127702
	2.	4,56	28,7	17,0695577
	3.	2,34	11,65	6,583164133
12:00	4.	11,49	22,8	7,997377695
	5.	3,37	10,32	4,914392129
	6.	5,26	6,71	1,025304833
15:00	7.	3,08	5,34	1,598061325
	8.	2,63	12,3	6,837722574
18:00	9.	7,98	6,5	1,046518036
	10.	4,56	5,47	0,643467171
	11.	3,86	9,48	3,97394011
21:00	12.	9,1	10,27	0,827314934
	13.	3,14	3,4	0,183847763
0:00	14.	5,6	9,15	2,510229073
	15.	8,54	27,33	13,28653642
3:00	16.	10,21	22,58	8,746910883
	17.	4,34	12,97	6,102331522
	18.	4,1	6,72	1,852619767
6:00	19.	15,8	33,68	12,64306925
	20.	7,64	22,16	10,26719046

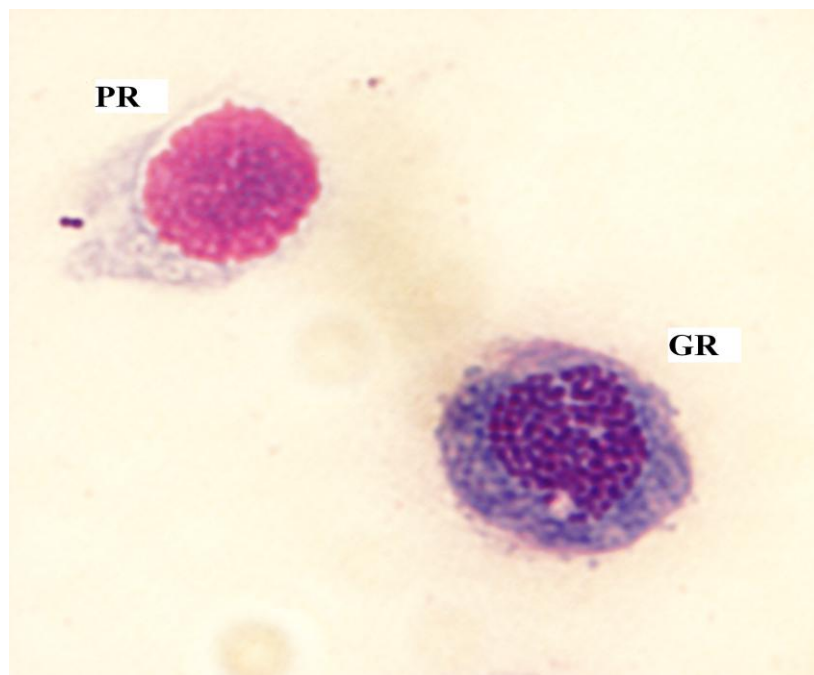
zdroj: vlastní výzkum

Příloha 3: Měření č. 4. Tabulka naměřené koncentrace hemocytů na ELISA readru při vlnové délce 620 nm. Výsledky jsou uvedeny v mmol/l.

Čas	Číslo vzorku	c (mmol/l)		směrodatná odchylka
		a)	b)	
9:00	1.	5,98	8,75	1,958685784
	2.	5,36	21,69	11,54705374
	3.	7,61	13,25	3,988082246
12:00	4.	3,23	15,53	8,697413409
	5.	4,34	9,26	3,478965363
	6.	5,15	6,59	1,018233765
15:00	7.	5,05	7,35	1,626345597
	8.	3,85	12,62	6,201326471
	9.	10,03	15	3,514320702
18:00	10.	3,1	10,35	5,126524164
	11.	6,53	13,03	4,596194078
21:00	12.	2,21	5,41	2,2627417
	13.	7,2	32,84	18,13021787
	14.	3,35	3,4	0,035355339
0:00	15.	6,6	27,9	15,06137444
	16.	3,105	11,73	6,098795988
	17.	5,12	26,33	14,99773483
3:00	18.	2,26	8,82	4,638620485
	19.	5,12	19,01	9,821713191
	20.	6,305	21,31	10,61013725
6:00	21.	2,93	4,09	0,820243866
	22.	12,96	17,93	3,514320702
	23.	6,52	7,42	0,636396103

zdroj: vlastní výzkum

Příloha 4: Prohemocyt a Granulocyt



Zdroj: vlastní výzkum