

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Zdravotně sociální fakulta

**Morfocytometrické charakteristiky haemocytů ve srovnávací  
hematologii**

Bakalářská práce

Autor: David Šubjak

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

Datum odevzdání: 6.5.2010

Morfocytometric characteristic of haemocytes in comparative haematology.

#### Abstract

Standard haematological procedures in preclinical toxicity studies are mostly carried out on mammals, more recent haematotoxicological models represent invertebrates because they can be used in the screening of myelotoxicity. In the present study, we examined haemocytes of *Culex pipiens* as a new potential alternative haematological in vivo model. Preparations for microscopic analysis were made from the hemolymph stained by Pappenheim's method for overstriking morphology and by toluidin blue and AgNOR for overstriking nucleoles. Microscopic photos were processed by image analysis and size of cells, nuclei and nucleoli were evaluated. Six types of haemocytes were found: granulocytes, prohemocytes, spherulocytes, plasmocytes, adipohemocytes and oenocytes. Thanks to image analysis we made a morfometric profile of each type of haemocytes and set the nucleolar coefficient. We described significant differences among prohemocytes, plasmocytes and oenocytes size. On the grounds of nucleoles size we divided haemocytes to next two significant groups. Image analysis seems to be very helpful for distinction among various haemocyte lines but we can't use it for generally separation without personal control thanks to presence of statistically significant findings for only some comparisons cell types.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Morfocytometrické charakteristiky haemocytů ve srovnávací hematologii vypracoval samostatně a použil 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 jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích .....

.....

Podpis studenta

**Poděkování:**

Rád bych tímto poděkoval svému školiteli prof. RNDr. Josefu Bergerovi, CSc. za odborné vedení a poskytnutí cenných informací při psaní mé bakalářské práce.

Dále děkuji doc. RNDr. Ivanovi Gelbičovi, CSc. a jeho asistentce Barboře Kozelkové z Entomologického ústavu AV ČR za poskytnutí experimentálního materiálu.

## Obsah:

Úvod .....	7
<b>1. Současný stav.....</b>	<b>8</b>
1.1. Oběhový a imunitní systém hmyzu .....	8
1.2. Haemocyty.....	8
1.3. Klasifikace haemocytů .....	9
1.4. Haemocyty čeledi <i>Culicidae</i> .....	10
1.5. Obrazová analýza.....	11
1.6. Biomodely.....	12
1.7. Nucleolus.....	13
<b>2. Cíle práce .....</b>	<b>15</b>
<b>3. Materiál a metody .....</b>	<b>16</b>
3.1. Odběr hemolymfy.....	16
3.2. Pappenheimovo panoptické barvení.....	16
3.3. Barvení toluidinovou modří dle Smetany.....	16
3.4. AgNOR .....	17
3.5. Obrazová analýza .....	18
3.6. Statistika .....	18
<b>4. Výsledky .....</b>	<b>19</b>
4.1. Morfologie haemocytů .....	19
4.1.1. Plasmocyt .....	19

4.1.2. Granulocyt .....	20
4.1.3. Prohemocyt .....	21
4.1.4. Sferulocyt .....	22
4.1.5. Adipohemocyt .....	23
4.1.6. Oenocyt .....	24
4.2. Procentuální zastoupení jednotlivých haemocytů .....	25
4.3. Barvení jadérek toluidinovou modří a AgNOR.....	26
4.4. Morfometrické charakteristiky haemocytů .....	29
<b>5. Diskuze .....</b>	<b>31</b>
5.1. Odběr hemolymfy.....	31
5.2. Klasifikace haemocytů a diferenciální počet .....	31
5.3. Barvení jadérek pomocí toluidinové modří a AgNOR .....	35
<b>6. Závěr .....</b>	<b>36</b>
<b>7. Literatura .....</b>	<b>37</b>
<b>8. Klíčová slova .....</b>	<b>45</b>

## Úvod

V dnešní době si můžeme povšimnout, že se v mnoha biomedicínských studiích v oblastech laboratorní hematologie, imunologie či toxikologie používají jako biomodel v preklinické části testování převážně savci, kteří mají určitou fylogenetickou podobnost s člověkem. Tyto studie týkající se testování nových léčebných postupů a bezpečnosti léčiv však narážejí na určité právní a etické problémy, které jsou rovněž spojené s ekonomickou zátěží.

Vyvstává tedy otázka, zdali by se dalo využít pro preklinické testy jiné živočišné druhy, které by tyto právní a etické problémy odstranily či zmírnily a tím zároveň i snížily ekonomickou zátěž v preklinické části testování. Vhodnými adepty pro nový biomodel v této části testování by se mohli stát bezobratlí, zejména díky právnímu vymezení, nenáročnému chovu, rychlosti rozmnožování a rychlému vývoji. Jedním z největších problémů využití bezobratlých jako biomodelu je však nedostatečná znalost jejich fyziologických funkcí a hodnot. Tak je tomu i v experimentální hematologii, kde nejsou zcela prozkoumány haemocyty bezobratlých přítomné v hemolymfě. Již v mnoha vědeckých publikacích byli bezobratlí předmětem zkoumání, avšak i přesto narážíme na určitou nesourodost nomenklatury objevených haemocytů. Rozmanitost řádu bezobratlých vede k poměrně vysoké fyziologické, strukturní i funkční variabilitě. Kvůli omezenému množství objemu hemolymfy, použití rozdílných metod pozorování či používání různých laboratorních postupů nacházíme rozdílné výsledky.

Proto jsme se rozhodli vybrat jednoho zástupce rodu bezobratlých, konkrétně komára druhu *Culex pipiens*, u kterého za použití světelné mikroskopie, obrazové analýzy a barvicích metod určíme morfometrické charakteristiky haemocytů, které budou sloužit jako zdroj informací o stavu haemocytů za fyziologických podmínek. Tímto krokem se otevírá možnost využít tento species jako biomodel v preklinické části testování.

## 1. Současný stav

### 1.1. Oběhový a imunitní systém hmyzu

Oběhový systém hmyzu se skládá z tekuté složky - hemolymfy, což je tekutina, která je čirá, viskózní a slámově žluté barvy (Khanna 1964, Jones 1965). Hemolymfa proudí v tělní dutině nazvané haemocoel (Haine et al. 2007), její proud je podmíněn metabolismem, pohybem a hřbetní cévou, která udržuje kontinuální proud hemolymfy (Tartes et al. 2002). Další složkou oběhového systému je složka celulární, která představuje i jednu ze složek imunitního systému organismu (Brayner et al. 2005). Humorální složku imunitního systému zajišťují antimikrobiální peptidy (Lowenberger 2001), reaktivované volné radikály dusíku a kyslíku (Nappi et al. 2000) a enzymatická kaskáda, která způsobuje regulovatelnou koagulaci k zastavení patogena (Muta et al. 1996). Další významnou obranou proti patogenům je schopnost fagocytózy hlavně u granulocytů (Asgari and Schmidt 2003), dále schopnost „encapsulace“, což je obklopení cizorodé látky nejprve mikrofiláriemi a dále plazmocyty, které vytvoří kapsuly, na kterou poté útočí elektron denzní haemocyty (Chen and Laurence 1985), a v neposlední řadě „melanizace“ (Asgari and Schmidt 2003).

### 1.2. Haemocyty

Poprvé byly haemocyty popsány u *Pediculus humanus* Janem Schwammerdanem v roce 1758 jako takzvané „bílé krevní buňky“ (Crosley 1975). Můžeme je najít už v embryonálních stádiích, kde mají mezodermální původ (Dorn 1978). Haemocyty se vyplavují do hemolymfy z hemopoetických orgánů, které jsou složené z iregulárních buněk a které se formují do hvězdicovitého tvaru retikulární buňky (Ling 2009, Francois 1975). Po vyplavení nemůžeme vyloučit, že se haemocyty po uvolnění do oběhu dále nediferencují či nedochází-li k transformaci na jiný typ buněk (Berger 2008). Dosud nebylo mnoho napsáno o všech typech haemocytů, které se vyskytují v říši hmyzu, včetně jejich počtu u jednotlivých druhů, či o jejich ekonomické důležitosti. Je to dáno hlavně malou velikostí hmyzu, dále naopak velkým počtem druhů hmyzu a s tím i spojenými malými hodnotami v počtu buněk k identifikaci, které jsou závislé na množství cirkulující hemolymfy (Castillo et al. 2006).



K porovnávání a poté klasifikaci haemocytů se v pramenech objevují různé způsoby. Nejčastěji se využívá světelná mikroskopie (Araujo et al. 2008, Aladaileh et al. 2007, Battison et al. 2003, Da Silva et al. 2000), dále transmisní elektronová mikroskopie (Berger and Slavíčková 2008, Araujo et al. 2008, Brayner et al. 2005), skenovací elektronová mikroskopie (Mahilini and Rajendran 2008, Aladaileh et al. 2007) imunofluorescence (Castillo et al. 2006) nebo se používá přítomnost monoklonálních protilátek mAb proti jednotlivým druhům haemocytů (Gardiner and Strand 1999).

### 1.3. Klasifikace haemocytů

Klasifikace hmyzích haemocytů byla původně založena na morfologii, která byla pozorovaná pod světelným a elektronovým mikroskopem. Zatím nebyly popsány haemocyty u všech druhů říše hmyzu, ale bylo rozpoznáno základních sedm typů haemocytů, které jsou nejběžnější. Řadíme sem adipohemocyty, oenocyty, plasmocyty, granulocyty, koaguocyty, prohocyty a sferulocyty (Cunha 2009, Lea 1986, Beaulaton 1979, Gupta 1979, Raina 1976). *Adipohemocyty* mají různou velikost, vyznačují se ovoidním tvarem s lipidovými a granulárními složkami v cytoplazmě, kde lze také zahlédnout drsné endoplazmatické retikulum a Golgiho komplex, což poukazuje na syntetickou a sekretoriální činnost buňky (Butt and Shields 1996, Barracco and Loch 1989, Gupta 1979). *Granulocyty* mají různou velikost a tvar. Jádro je malé a v cytoplazmě se nacházejí stejnotvaré acidofilní inkluze. Některé inkluze mají strukturální charakteristiky melanosomálních nebo premelanosomálních plastidů. V cytoplazmě se také nachází bohatá síť hrubého endoplazmatického retikula. Granulocyty se vyvíjejí z plasmocytů a jejich celkový objem v hemolymfě je od 30 do 65% (Raina 1976, Akai and Sato 1973, Hagopian 1971). *Oenocyty* jsou velké oválné buňky, u kterých se mohou v acidofilní cytoplazmě vyskytovat i dvě excentricky uložená jádra. Cytoplasma je hladká a hyalinní. Oenocyty se podílejí na transportu lipidů skrz svoji biomembránu (Butt and Shields 1996, Wigglesworth 1988, Locke 1969). *Plasmocyty* jsou zastoupeny vždy více než 28% z celkového rozpočtu haemocytů u většiny hmyzu. Mají různou velikost a tvar hlavně na rozhraní cytoplazmy. Jádro tvoří kolem 40-50% buňky, v cytoplazmě se nacházejí basofilní granula, hrubé

endoplazmatické retikulum a Golgiho komplex. Plasmocyty jsou pohyblivé buňky schopné fagocytózy. Jsou tedy v první linii obrany proti patogenům a tedy velmi důležitou celulární složkou imunitního systému. Vypouštějí substance, které způsobují degranulaci granulocytů při konečné fázi enkapsulace, a také mohou pomocí svých specifických granul přivést granulocyty do apoptózy (Pech and Strand 2000, Raina 1976, Gupta 1979). *Prohemocyty* jsou nejmenší buňky v hemolymfě. Mají velké jádro a malý pruh basofilní cytoplazmy. V průběhu mitózy se z nich vyvíjí plasmocyty a pravděpodobně i granulocyty. *Prohemocyty* však pocházejí z kmenových buněk, ale v odborných pramenech lze nalézt i tezi, že *prohemocyty* mohou být kmenovými buňkami. Dosud byla dobře popsána transformace *prohemocytů* na granulocyty, plasmocyty a sferulocyty. (Berger and Slavičková 2008, Yamashita and Iwabuchi 2001, Akai and Sato 1973). *Koagocyty* jsou z pravidla malé buňky, které jsou hyalinní, křehké a nestálé. Jádro mají relativně malé a excentricky uložené (Gupta 1979). *Sferulocyty* jsou ovoidní buňky obvykle větší než *prohemocyty*, ale menší než některé plasmocyty. V některých případech jsou sferulocyty zastoupeny okolo 4 %. Cytoplazma obsahuje velké acidofilní inkluze. V některých případech se mohou sferulocyty vyvinout z *prohemocytů* (Yamashita and Iwabuchi 2001, Ashhurst 1982).

#### 1.4. Haemocyty čeledi *Culicidae*

*Prohemocyty* jsou nejmenší buňky vyskytující se v hemolymfě, buňka má kulovitý profil s průměrem 5-8  $\mu\text{m}$ . Z celkového počtu haemocytů u rodu *Culex* představují 9,3 %. *Prohemocyty* mají velké, centrálně umístěné jádro, které vyplňuje téměř celou buňku, takže cytoplasma zaujímá jen úzkou oblast kolem jádra. Chromatin je rozptýlený a v některých buňkách jsou přítomna jadérka. V cytoplazmě můžeme vidět pouze málo organel, viditelné je hrubé endoplazmatické retikulum a mitochondrie (Brayner et al. 2005, Akai and Sato 1977). *Sferulocyty* jsou oválné buňky o průměru 8-10  $\mu\text{m}$ , mají kulaté jádro, které má kondenzovaný chromatin s velkým jadérkem. Cytoplazma obsahuje organely, jako jsou hrubé endoplazmatické retikulum a mitochondrie. *Sferulocyty* představují 1,6 % z celkového počtu haemocytů (Brayner et al. 2005). *Adipohemocyty* jsou vzácné, malé a protáhlé buňky velikosti 8-15  $\mu\text{m}$

na délku. Adipohemocyty obsahují kulaté jádro, uvnitř cytoplasmy se nacházejí lipidové vezikuly, mitochondrie a denzní granula. Tvoří pouze 0,8% z celkového rozpočtu haemocytů (Brayner et al. 2005, Akai and Sato 1977). *Oenocyty* mají kulatý tvar, který má přibližně 6-13  $\mu\text{m}$  v průměru, s malým, excentricky uloženým jádrem. Cytoplazma je bohatá na vakuoly, které mohou být naplněné heterogenním elektrodenzním materiálem nebo naopak mohou být zcela prázdné. V cytoplazmě se objevuje také hladké endoplazmatické retikulum a mitochondrie. *Oenocyty* tvoří kolem 4,6% z celkového rozpočtu cirkulujících haemocytů (Brayner et al. 2005, Akai and Sato 1977). *Plasmocyty* jsou nejčastěji pozorované buňky, představují 43,4% z celkového počtu. Jsou pozorované dva typy těchto buněk, granulované a agranulované plasmocyty. Tyto buňky jsou velmi polymorfní, mohou mít různé větvenovité tvary, popř. může jít o buňky kulatého tvaru v průměru 6-22  $\mu\text{m}$ . Plazmatická membrána se vyznačuje značnými filopodiemi a pseudopodiemi. Většina plasmocytů má pouze jedno jádro, ale byly také pozorovány buňky plasmocytů s dvěma jádry. Uvnitř cytoplasmy se nachází více protáhlé a kulaté mitochondrie, hrubé endoplazmatické retikulum, Golgiho komplex a vakuoly (Brayner et al. 2005, Akai and Sato 1977). *Granulocyty* mají kulovitý, až větvenovitý tvar v průměru měří 8-13  $\mu\text{m}$  v a představují 40,3% z celkové populace haemocytů. Plazmatická membrána má nepravidelné pseudopodia a filopodia na svém povrchu. V cytoplazmě jsou uloženy kulaté nebo podlouhlé mitochondrie, hrubé endoplazmatické retikulum s hojnými ribozomy (Brayner et al. 2005, Akai and Sato 1977).

### 1.5. Obrazová analýza

Stávající potenciál biotechnologické aplikace obrazové analýzy a systémů pro zpracování obrazu jsou již přezkoumávány. Systémy obrazové analýzy se ukazují být velmi univerzálním a účinným nástrojem pomoci pro biotechnologický výzkum. Předpokládá se, že systémy obrazové analýzy budou umožňovat rychlejší a přesnější kvantifikaci mnoha biotechnologických analýz (Vecht-Lifshitz and Ison 1992). Základní obrazová analýza spočívá v měření délek, ploch studovaných objektů a určování histogramů v jednotlivých barevných prostorech. K zvýraznění pozorovaných objektů lze také použít barevné separace do různých barevných prostorů,

různé metody filtrace, bitové operace s jednotlivými pixely obrázku nebo diskrétní analýzu pomocí různého stupně šedi. Při rutinním zpracování je možné použít programu, který nám jednotlivé úpravy udělá automaticky (Uozumi et al. 1993, Vincent 1993, Protz et al. 1992). Obrazová analýza se skládá z několika kroků: získání obrazu, segmentace, vnější a vnitřní obrazová extrakce rysů, klasifikace a interpretace (Zapotoczny et al. 2008). Obrazovou analýzou se zabývá mnoho prací, kde autoři řeší hlavně technické parametry obrazové analýzy, matematické parametry či softwarové problémy (de Carvalho et al. 2007, Shelton et al. 2005, McInerney et al. 2002, Eilertsen et al. 1996).

Obrazová analýza se využívá již několik let a v mnoha odvětvích vědy a výzkumu - především v medicínských a biologických odvětvích. Například při spojení s ultrazvukem lze pořízené snímky použitím obrazové analýzy vyhodnotit a určit patologické změny na žlučníku (Bodziocha and Ogielab 2009), dále se například obrazové analýzy využívá v neurochirurgii při sestavování celkového obrazu tumoru, kdy se spojují obrazové technologie s předpokládaným růstem a histologickými předpoklady. Kvantifikují se faktory, které nejsou přímo ihned objasněny, jako jsou: předpokládaný růst, utlačení okolní tkáně či reakce na léčbu (Konukoglua et al. 2009). Obrazové analýzy lze i využít při sledování počtu apoptických buněk živočichů se spojením s průtokovým citometrem a příslušným softwarem. Tímto postupem lze dosáhnout nezávislých výsledků měření. Toto je velmi důležité například při výrobě některých produktů používaných v medicíně, kdy daná kultura, která obsahuje velké množství apoptických buněk, může být nepoužitelná, a tím se zvyšuje ekonomická zátěž výrobku (Pläsier et al. 1999).

## 1.6. Biomodely

V dnešní době se v biomedicínských studiích používají jako biomodely převážně savci kvůli jejich fylogenetické podobnosti s člověkem; tyto studie se týkají nových léčebných postupů a testování bezpečnosti (Levine et al., 2004). Pokusy na zvířatech jsou pod právní kontrolou, která odráží kulturní, politické, etické a ekonomické vlivy daného státu. Používání pokusných zvířat tak naráží na řadu předpisů, které musí být splněny (Berger 2003, Paixão 1999). Vystávají otázky práv zvířat při jejich používání

jako biomodelu. Jde o otázky usmrcení, velikost utrpení vzhledem k výzkumu a jiné (Bekoff et al. 1994). Zatím se neuvažuje o náhradě savců a ostatních obratlovců, kteří pravděpodobně zůstanou biomodely zejména ve výzkumu toxicity na embryonální vývoj. Hledají se však i jiné biomodely v říši bezobratlých, které by se také daly použít v preklinické části výzkumu. V současné době jsou ve výzkumu v oblasti laboratorní hematologie, imunologie i toxikologie velmi oblíbenými experimentálními živočichy právě bezobratlí. Toto tvrzení se opírá o skutečnost, že nejsou nároční na chov jako již zmiňovaní obratlovci. Jejich rozmnožování a vývoj navíc umožňují postupovat ve výzkumu rychleji a také zde samozřejmě odpadá i mnoho etických problémů (Berger 2005). Jedním z největších problémů využití hmyzu jako biomodelu je však nedostatečná znalost jejich fyziologických funkcí a hodnot. Tak je tomu i v experimentální hematologii, kde nejsou zcela prozkoumány haemocyty hmyzu přítomné v hemolymfě. Byly sice již v mnoha vědeckých pracích předmětem zkoumání, avšak i přesto narážíme na určitou nesourodost jak nomenklatury, tak objevených haemocytů, ale i určení jejich funkcí, které rovněž nejsou zcela prozkoumány. Připisujeme to poměrně vysoké fyziologické strukturní i funkční variabilitě, omezenému množství objemu hemolymfy, použití rozdílných metod pozorování, užití různých laboratorních postupů a technik. Záleží také na podmínkách experimentu, které nejsou standardizované (Pech et al. 1994, Strand a Johnson 1996).

### 1.7. Nucleolus

Nucleolus neboli jadérko je oblast jádra, kde se vytváří ribozomy (Hernandez-Verdun 2004). Poprvé bylo popsáno roku 1774 Feliciem Fontanou ve světelném mikroskopu (Bush a Smetana 1970). Struktura jadérka může být považována za morfologické vyjádření své funkční činnosti, související se syntézou preribosomální ribonukleové kyseliny. Jadérko představuje i skladovací prostor pro tyto molekuly, které se nacházejí v nucleolárních regionech (Smetana 2002). Stěžejní role jadérka tedy spočívá v ribozomální syntéze, která byla známa již od roku 1960, ale až výzkum v posledním desetiletí prokázal implicitní funkci jadérka při výrobě mRNA překladových mechanismů. Bylo také prokázáno, že v jadérku vyzárají malé molekuly RNA, včetně tRNA a snRNA (Hinsby et al., 2006). Velikost jadérek se může lišit

v závislosti na fyziologických či patologických stavech (Berger 2008). Jadérka mohou být klasifikována podle velikosti a distribuce RNA do tří hlavních nucleolárních typů. Za první: velká jadérka s relativně rovnoměrně rozdělenou RNA, která můžeme nazvat jako kompaktní. Za druhé: prstenčité formovaná jadérka s RNA pouze v nucleolárně periferní části s jedním velkým fibrilárním centrem. A za třetí: mikrojadérka, která kvůli jejich velikosti není možné jasně vidět ve světelném mikroskopu. Mikrojadérka jsou snadno viditelná až v buňkách, které jsou obarvené stříbrem díky reakci s AgNOR či toluidinovou modří (Smetana 2002).

## **2. Cíle práce**

- I. Cílem této práce je stanovit morfometrické charakteristiky všech druhů haemocytů druhu *Culex pipiens* pomocí světelného mikroskopu a základních barvicích metod používaných v laboratorní hematologii.
- II. Ověřit využitelnost základních možností obrazové analýzy pro přesnější rozlišení haemocytů při rutinním laboratorním hematologickém vyšetření.

### 3. Materiál a metody

#### 3.1. Odběr hemolymfy

Hemolymfu jsme odebrali z osušené larvy *Culex pipiens* několika vpichy preparační jehlou po celém povrchu larvy na čistém podložním sklíčku. Ihned po odebrání hemolymfy a odstranění larvy jsme zhotovili roztěr hemolymfy pomocí druhého sklíčka. Roztěry jsme ponechali na suchém a čistém místě do zaschnutí. Poté jsme preparáty barvili různými barvicími technikami pro získání potřebných morfologických dat. Hemolymfu jsme opakovaně odebírali deseti až dvaceti larvám z testovací skupiny.

#### 3.2. Pappenheimovo panoptické barvení

Toto barvení jsme použili jako hlavní barvicí metodu pro určování morfologických charakteristik s pomocí obrazové analýzy. Usušené preparáty jsme barvili v May-Grümwaldově roztoku po dobu 6 minut, poté jsme oplachovali 3 minuty v destilované vodě. Po opláchnutí jsme preparáty přemístili do kyvety, kde jsme si předem připravili roztok Giemsy-Romanovského s vodou v poměru 1:3 a nechali jsme dobarvit po dobu 30 minut. Poté jsme preparáty opět oplachovali destilovanou vodou, dokud nepřestala odtékat modrá barva. Nakonec jsme nechali obarvené preparáty volně na vzduchu zaschnout. Dobře obarvené preparáty mají fialovou barvu a buňky při mikroskopování mají různé odstíny fialové od modré po červenou. Pappenheimovo panoptické barvení se běžně využívá v hematologii k určení diferenciálního rozpočtu leukocytů. Toho jsme také využili v této práci, kdy jsme vyhodnotili diferenciální rozpočet haemocytů (DHC= differential haemocyte count) ve světelném mikroskopu při zvětšení objektivu 100x. Diferenciální rozpočet byl utvářen z minimálně 50 spočítaných buněk.

#### 3.3. Barvení toluidinovou modří dle Smetany

Nejprve jsme si připravili McIlvainův pufr o pH 5,0. Rozpustili jsme 10,5 g kyseliny citrónové a 35,8 g hydrogenfosforečnanu sodného v 500 ml destilované vody



a zkontrolovali jsme pH pomocí indikačního papírku. Poté jsme si připravili pracovní roztok, jenž byl vytvořen rozpuštěním 0,03 g toluidinové modři Standart v 10 ml McIlvainova pufru o pH 5,0. Konečná barvicí směs vznikne naředěním pracovního roztoku s McIlvainovým pufrům v poměru 1:50. Preparáty jsme postupně barvili v časovém rozmezí 5 - 30 minut, abychom zjistili optimální čas pro obarvení buněk, aby nedocházelo k nedostatečnému obarvení či přebarvení. Po ukončení barvení jsme opláchli preparáty McIlvainovým pufrům. Jako optimální čas jsme vyhodnotili 10 minut, kdy byly buňky dostatečně obarvené, ale ještě nedošlo k přebarvení. Struktury obsahující RNA včetně jadérek se barví od modré po fialovou barvu. Preparáty jsme vyhodnotili pomocí světelného mikroskopu při zvětšení objektivu 100x s imerzí. Pomocí této metody jsme vyhodnotili tři typy jadérek: kompaktní jádérka (aktivní haemocyt), prstenčitá jádérka (reverzibilně klidové stadium) a mikrojadérka (ireverzibilně klidová). Následně jsme změřili plochy jadérek a stanovili nukleolární index, který vyjadřuje počet nukleolů na počet buněk.

#### 3.4. AgNOR

Jako další možnost znázornění jadérek jsme použili barvení dle Howela a Blacka stříbrem. Nejprve jsme si připravili dva pracovní roztoky, a to roztok želatiny, kterou jsme připravili rozpuštěním 2 g želatiny p.a. v 100 ml 1% kyseliny mravenčí. Druhý pracovní roztok jsme připravili rozpuštěním 2,5 g dusičnanu stříbrného v 5 ml destilované vody. (Roztok dusičnanu stříbrného musíme uchovávat v temnotě, jinak dojde k nechtěnému vyredukování stříbra světlem.) Před samotným barvením jsme oba roztoky smíchali v poměru 1:1 a převrstvili připravené preparáty a na 25 minut jsme je umístili do tmy. Nakonec jsme preparáty opláchli pod tekoucí vodou a ve svislé poloze jsme je nechali usušit. Dobře obarvené preparáty mají hnědožlutou barvu. Během mikroskopování při zvětšení objektivu 100x jsou jasně viditelná tmavě zbarvená jádérka. Pomocí této barvicí metody jsme měřili plochy jadérek a zaznamenali jejich počet pro vyhodnocení nukleolárního indexu.

### 3.5. Obrazová analýza

Fotografie pro obrazovou analýzu jsme vytvořili s pomocí CCD kamery na mikroskopu značky Nikon eclipse 50i s imerzním objektivem zvětšujícím 100x. Obrazovou analýzu jsme provedli v softwaru NIS Elements 2.30 od společnosti Nikon. Každou fotografii jsme podrobili úpravami zaostření, saturací barev, vybalancování bílé barvy a pozadí tak, aby buňky na fotografiích byly co nejostřejší a mohly být zpracované pomocí metrických aplikací. U každé buňky obarvené pomocí Pappenheimovo panoptického barvení jsme změřili pomocí softwaru plochu buňky a plochu jádra tak, že jsme pomocí příslušné aplikace kladli měrné body kolem cytoplazmy a následně kolem jádra, dokud nedošlo k protnutí prvního a posledního metrického bodu. Software nám poté poskytl vypočítanou velikost vyznačené plochy. Tyto hodnoty jsme si pečlivě zapsali a dále zpracovali. U buněk obarvených toluidinovou modří či AgNOR jsme tento postup opakovali pro získání dat o velikosti plochy jadérek.

### 3.6. Statistika

Získané hodnoty velikostí buněk jsme rozdělili podle typu haemocytů a statisticky zpracovali pomocí oboustranného t-testu na hladině významnosti  $2\alpha = 0,05$ . Výsledky jsme uvedli jako velikosti buněk a jader  $\pm$  směrodatná odchylka průměru (tab. 2).

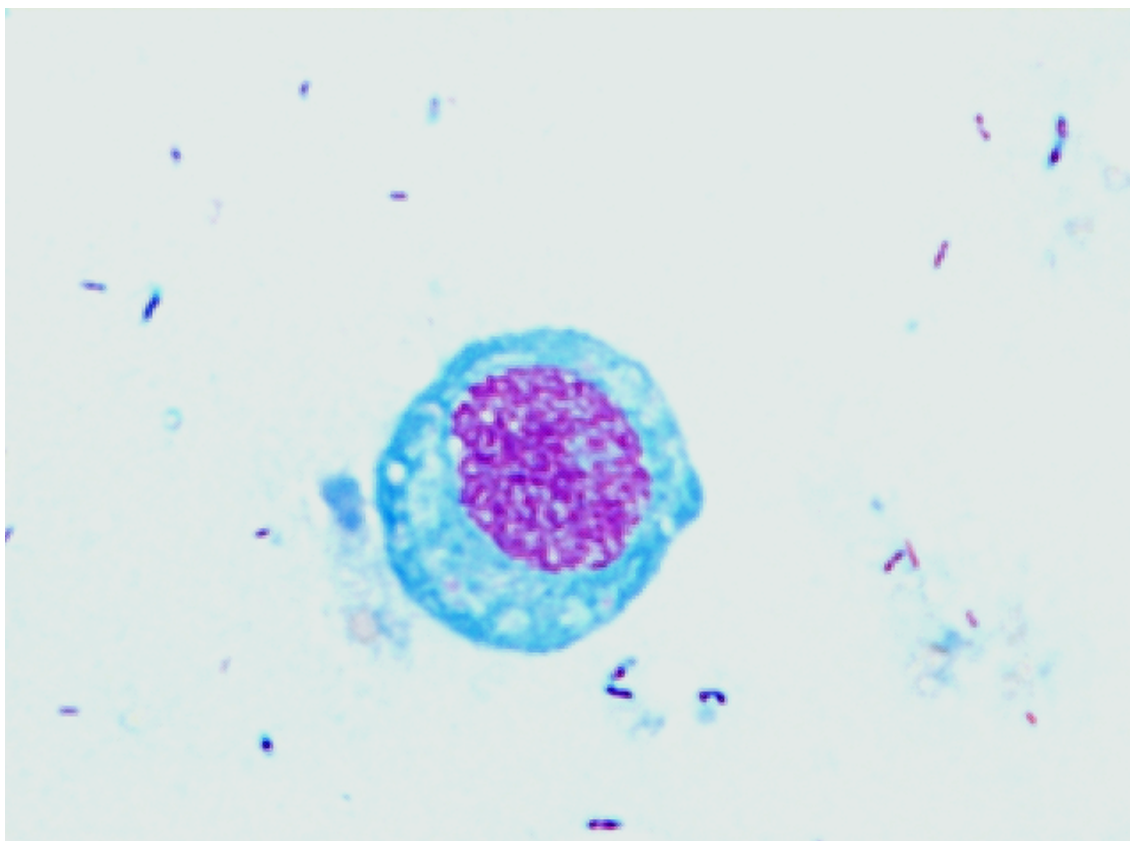
## 4. Výsledky

### 4.1. Morfologie haemocytů

Preparáty, které jsme obarvili pomocí Pappenheimovo panoptického barvení, jsme prostřednictvím světelného mikroskopu rozlišili na jednotlivé haemocyty našeho biomodelu *Culex pipiens* do šesti skupin. Za použití popisů z dostupné odborné literatury a našeho pozorování jsme tyto haemocyty rozdělili na tyto typy: plasmocyty, granulocyty, prohemocyty, oenocyty, adipohemocyty a sferulocyty. Morfologie všech typů haemocytů nebyla v našem případě vždy stejná, objevovaly se různé odchylky ve velikosti jednotlivých typů buněk a jejich barvitelnost mezi různými jedinci ve skupině také nebyla vždy totožná.

#### 4.1.1 Plasmocyt

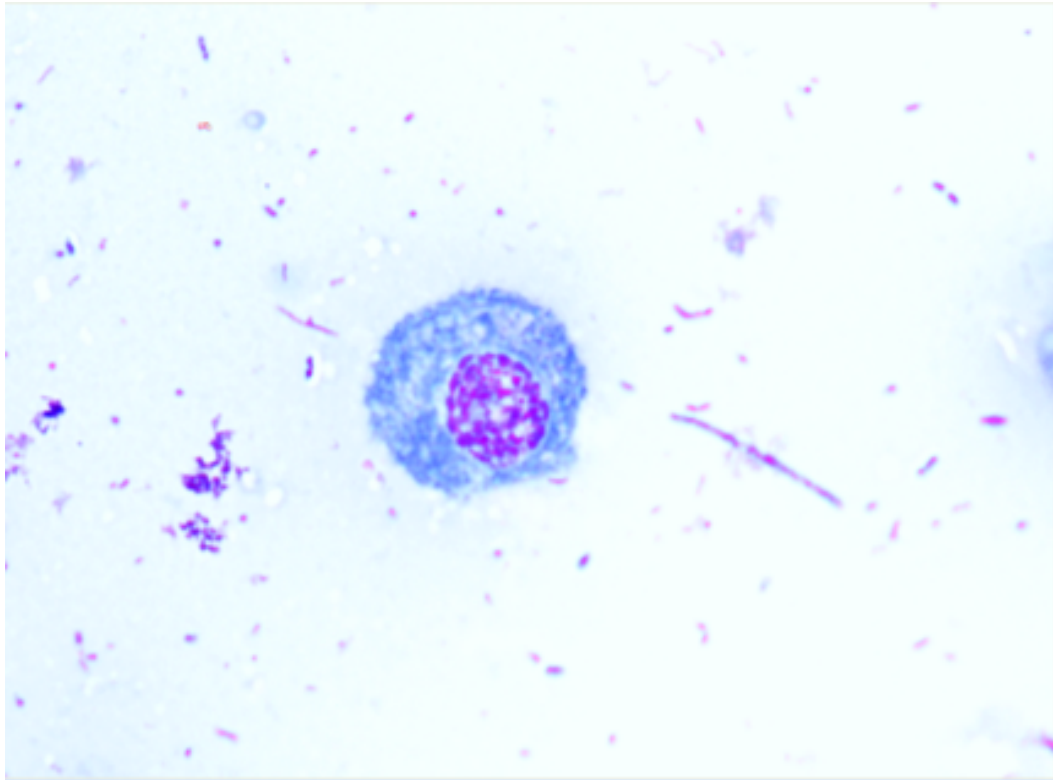
Plasmocyt je nejvíce zastoupený typ haemocytů v hemolymfě *Culexu* (obr. 1). Pro tyto buňky je typický kulovitý tvar a jejich velikost se pohybuje kolem 6-22  $\mu\text{m}$ . Někdy se na okrajích buněk mohou objevit výběžky připomínající panožky. Cytoplasma těchto buněk vyplňuje zhruba dvě třetiny buňky, barví se světle modře a neobsahuje žádná výrazná granula. Jádro bývá centrálně uložené a má viditelně hrubší chromatin, který se barví sytě červeně. Plocha těchto buněk se pohybuje okolo  $220\mu\text{m}^2$  a plocha jader plasmocytů má velikost přibližně  $71\mu\text{m}^2$ . Zastoupení plasmocytů v diferenciálním rozpočtu je 41,9 %.



Obr. 1. **Plasmocyt**

#### 4.1.2. Granulocyt

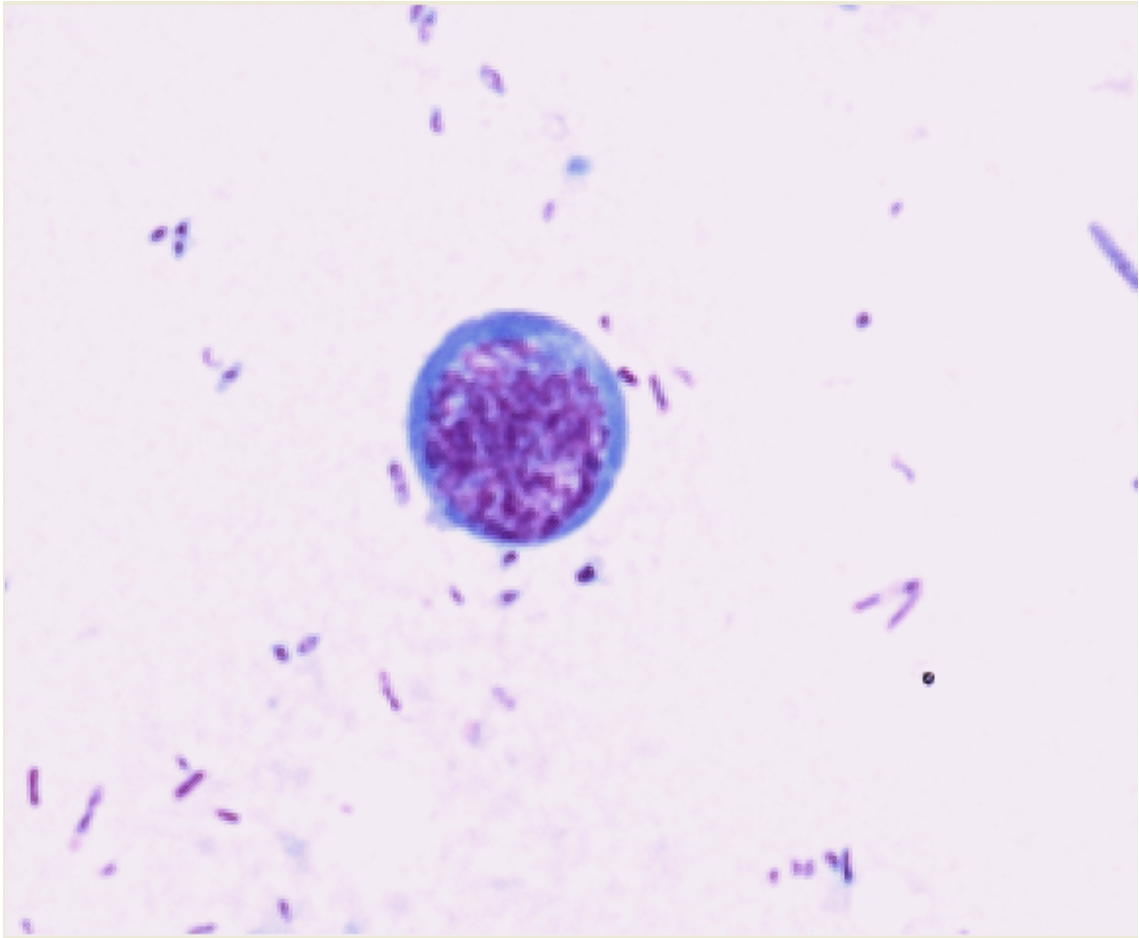
Granulocyt je druhý nejčastěji zastoupený haemocyt v hemolymfě našeho biomodelu (obr. 2). Jedná se o buňky kulovitěho tvaru o velikosti 8-13  $\mu\text{m}$ , mající tmavě modře zbarvenou cytoplasmu s granuly a světlejší jádro, které je centrálně uložené, ale u některých buněk můžeme vidět, jak se jádro více přibližuje k periferii buňky. Plocha granulocytární buňky se pohybuje kolem 111  $\mu\text{m}^2$  a plocha jádra tvoří přibližně 42  $\mu\text{m}^2$ . Z celkového rozpočtu haemocytů tvoří 35 %.



Obr. 2. **Granulocyt**

#### 4.1.3. Prohemocyt

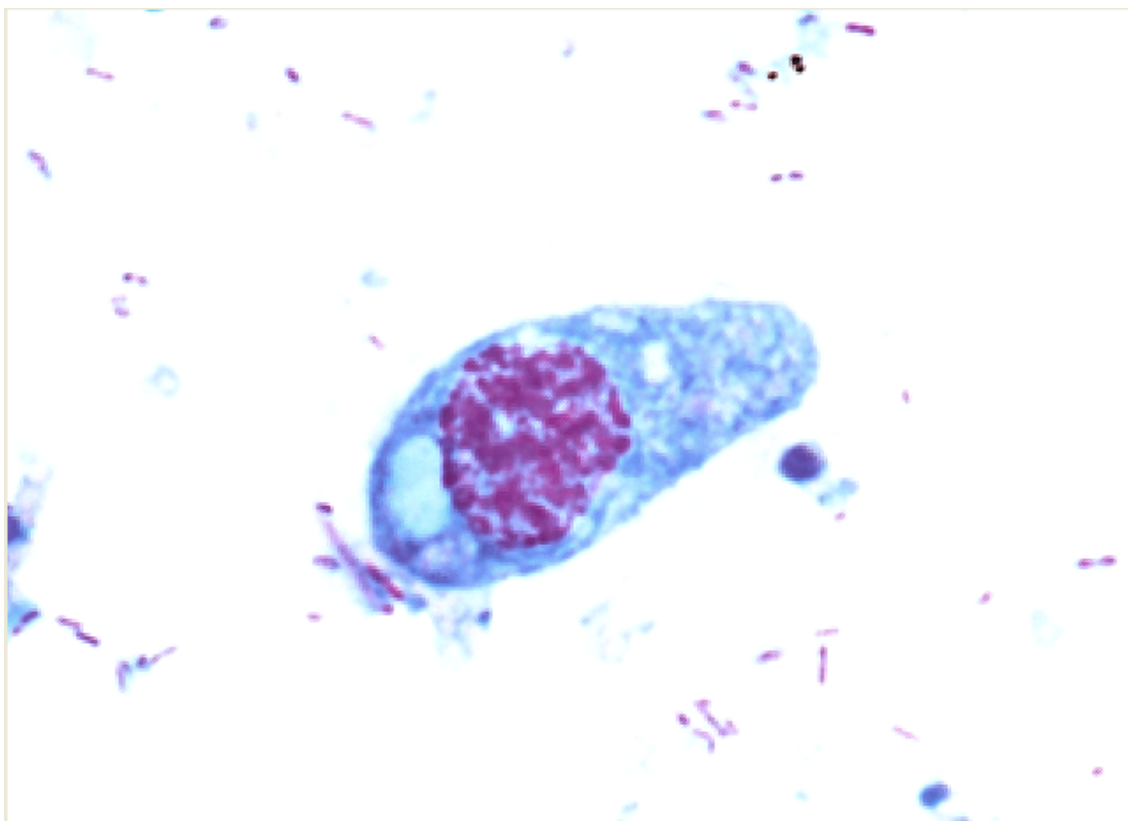
Prohemocyty jsou nejmenší buňky nalezené v připravených preparátech (obr. 3). Jedná se o buňky kulovitého tvaru s typicky velkým jádrem, které může překrývat i celý povrch buňky. Úzký pruh cytoplasmy kolem jádra má světle modrou bravu a je bez granul. Velikost prohemocytů se pohybuje v rozmezí 5-8  $\mu\text{m}$ , plocha těchto buněk byla naměřena kolem 52  $\mu\text{m}^2$ , z toho plocha jádra tvoří přibližně 32  $\mu\text{m}^2$ . Z celkového počtu haemocytů tvoří prohemocyty 7,8 %.



Obr. 3. Prohemocyt

#### 4.1.4. Sferulocyt

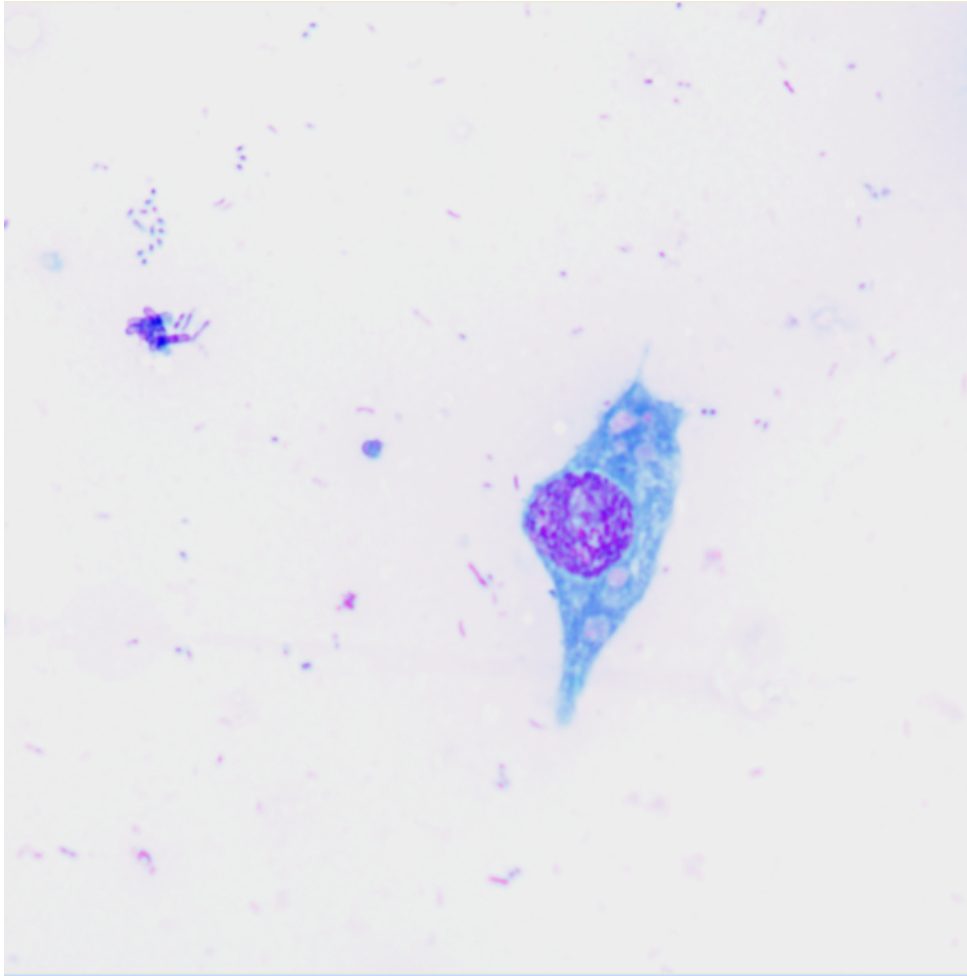
Sferulocyt je nejméně zastoupená buňka v celém rozpočtu haemocytů (obr. 4). Tyto buňky mají oválný tvar a dosahují velikosti kolem 8-10  $\mu\text{m}$ . Cytoplasma je světle modrá a obsahuje inkluze. Jádro je velké a centrálně uložené. Chromatin se barví jasnou červenou barvou a je hrubě uspořádaný. Plocha těchto buněk se pohybuje kolem 126  $\mu\text{m}^2$  a jádro má velikost přibližně 47  $\mu\text{m}^2$ . Z celkového rozpočtu haemocytů tvoří sferulocyty 0,63 %.



Obr. 4. Sferulocyt

#### 4.1.5. Adipohemocyt

Adipohemocyt má nejvíce specifický tvar ze všech haemocytů našeho biomodelu (obr. 5). Tyto buňky mají typický protáhlý vřetenovitý tvar s centrálně uloženým jádrem, které má hrubý chromatin barvící se sytě červeně. Cytoplasma se barví světle modře a může obsahovat granula. Velikost adipohemocytů se pohybuje v rozmezí 8-15  $\mu\text{m}$ , plocha těchto buněk byla naměřena kolem 112  $\mu\text{m}^2$ , z toho plocha jádra tvoří přibližně 30  $\mu\text{m}^2$ . Z celkového počtu haemocytů tvoří prohemocyty 1,9 %.

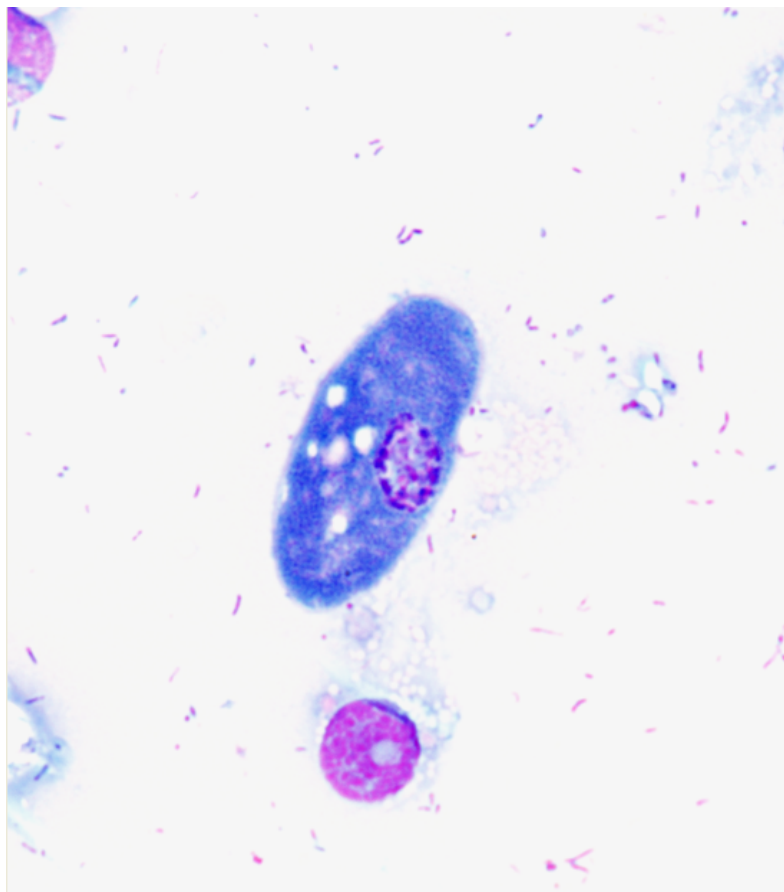


Obr. 5. Adipohemocyt

#### 4.1.6. Oenocyt

Oenocyty patří mezi největší buňky, které můžeme najít v hemolymfě *Culexu* (obr. 6). Jedná se o buňky protáhlého oválného tvaru o velikosti kolem 6-13  $\mu\text{m}$ , které mají tmavě modrou cytoplasmu s viditelnými vakuoly, které jsou pro tuto buňku typické. Jádro je malé a uložené při periferii buňky. Velikost plochy oenocytů se pohybuje kolem hranice 263  $\mu\text{m}^2$  a plocha jádra tvoří přibližně 39  $\mu\text{m}^2$ . Oenocyty tvoří z celkového rozpočtu haemocytu 2,5 %.

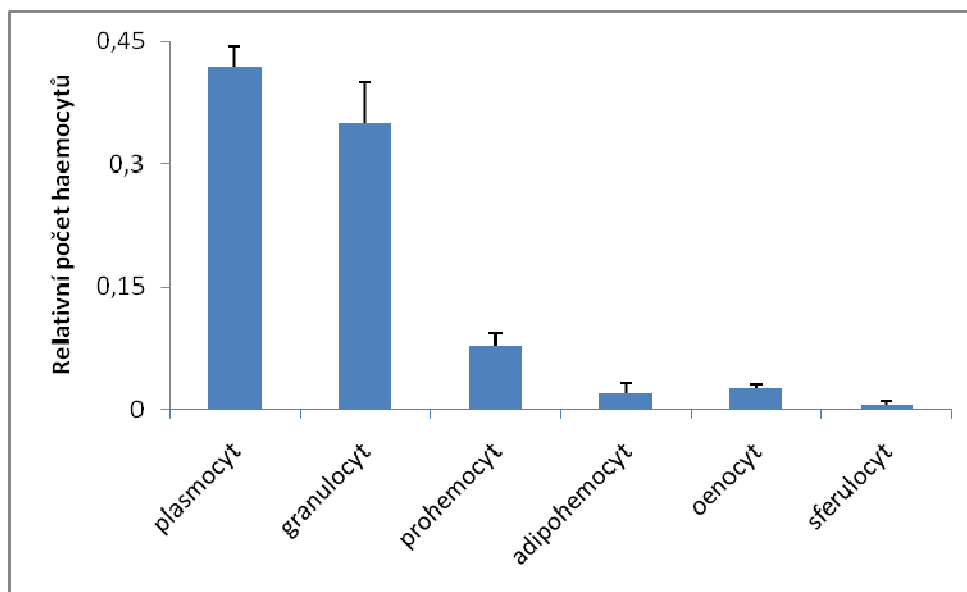




Obr.6. Oenocyt

#### 4.2. Procentuální zastoupení jednotlivých haemocytů

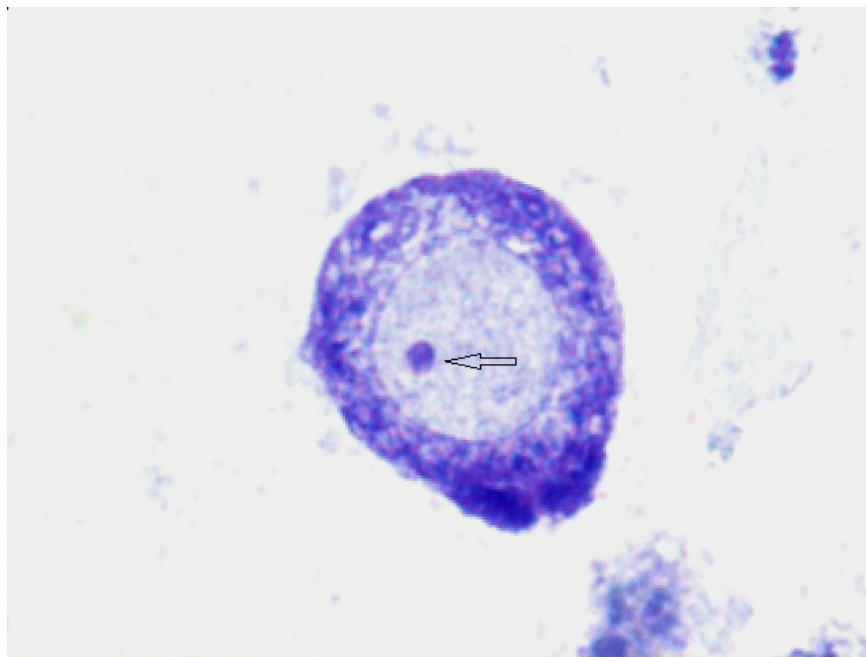
Pomocí četností jednotlivých hemocytů v pozorovaných preparátech jsme určili diferenciální rozpočet (obr. 7). Zjistili jsme, že nejvíce jsou v hemolymfě *C. pipiens* zastoupeny plasmocyty ( $41,9 \pm 2,4\%$ ), dále granulocyty ( $35 \pm 5,1\%$ ), prohemocyty ( $7,8 \pm 1,4\%$ ), adipohemocyty ( $1,9 \pm 1,2\%$ ), oenocyty ( $2,5 \pm 0,5\%$ ) a nejméně zastoupené jsou sferulocyty ( $0,63 \pm 0,5\%$ ).



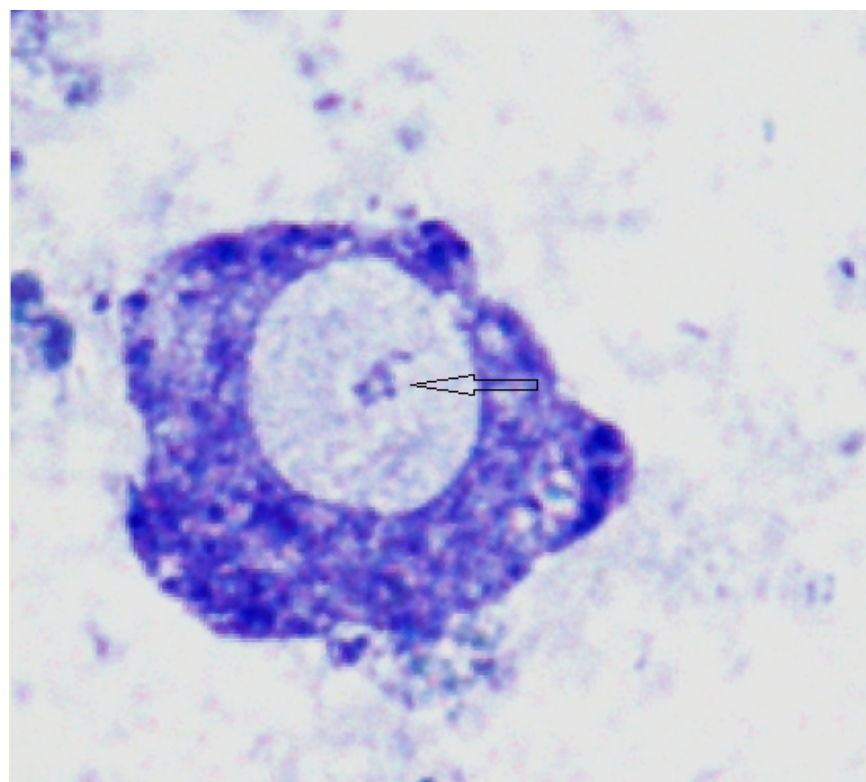
Obr. 7. Relativní počet jednotlivých typů haemocytů

#### 4.3. Barvení jadérek toluidinovou modří a AgNOR

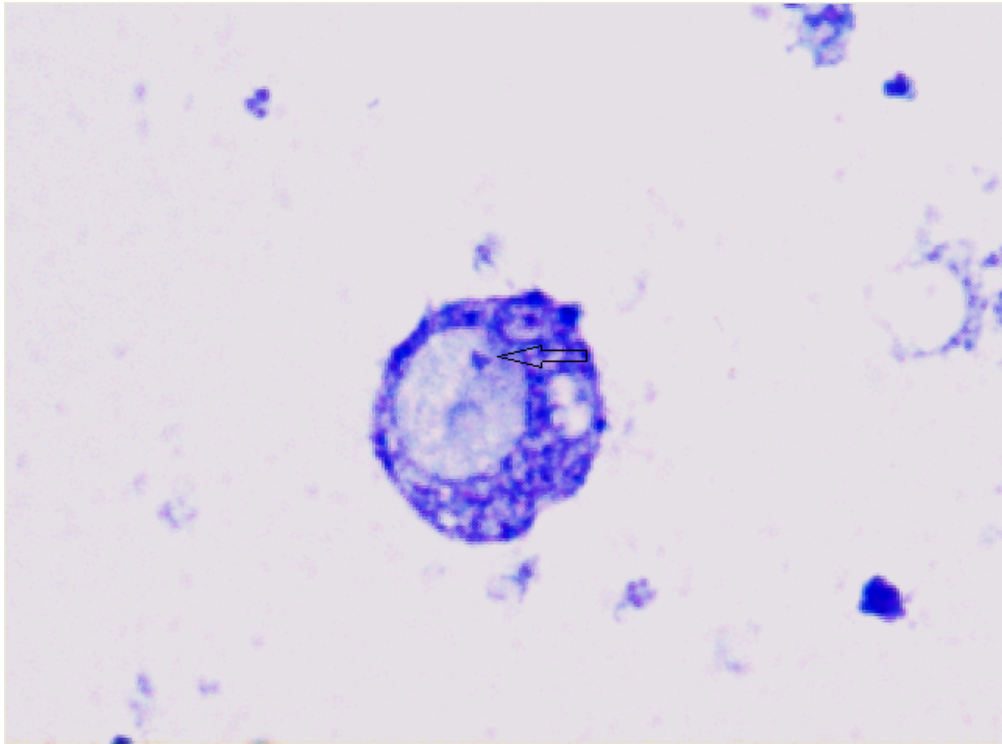
Po obarvení preparátů toluidinovou modří jsme byli schopni rozeznat tři druhy jadérek. Kompaktní jádérko, které se vyznačuje celistvým povrchem a dobrou zřetelností, jehož velikost dosahuje průměrně  $0,83 \pm 0,167 \mu\text{m}^2$ . Druhým typem je jádérko prstenčité, které, jak název napovídá, má tvar prstenu. Prstenčitá jádérka jsou velká průměrně  $1,7 \pm 0,336 \mu\text{m}^2$  a jsou dobře zřetelná. Posledním typem jsou mikrojadérka, která mají nejmenší velikost a nejsou vždy zřetelně viditelná. Jejich velikost se pohybuje průměrně mezi hodnotami  $0,33 \pm 0,076 \mu\text{m}^2$ . Dále jsme porovnali velikosti jadérek v závislosti na typu haemocytu. Do této studie jsme zahrnuli všechny typy, kromě sferulocytů, které se vyskytly v malém množství, a proto s nimi ve výsledcích není dále počítáno (tab. 1). Přesnější hodnoty o velikosti hmoty jadérek nám poskytuje barvení AgNOR, které zachycuje specifické kyselé proteiny v oblasti nukleárních organizátorů (NORs). Průměrná velikost takto obarvených jadérek je  $1,56 \pm 0,468 \mu\text{m}^2$ . Také jsme určili nukleární počet, který udává počet jadérek na počet buněk s výsledkem  $0,995 \pm 0,069$  jadérek na jednu buňku.



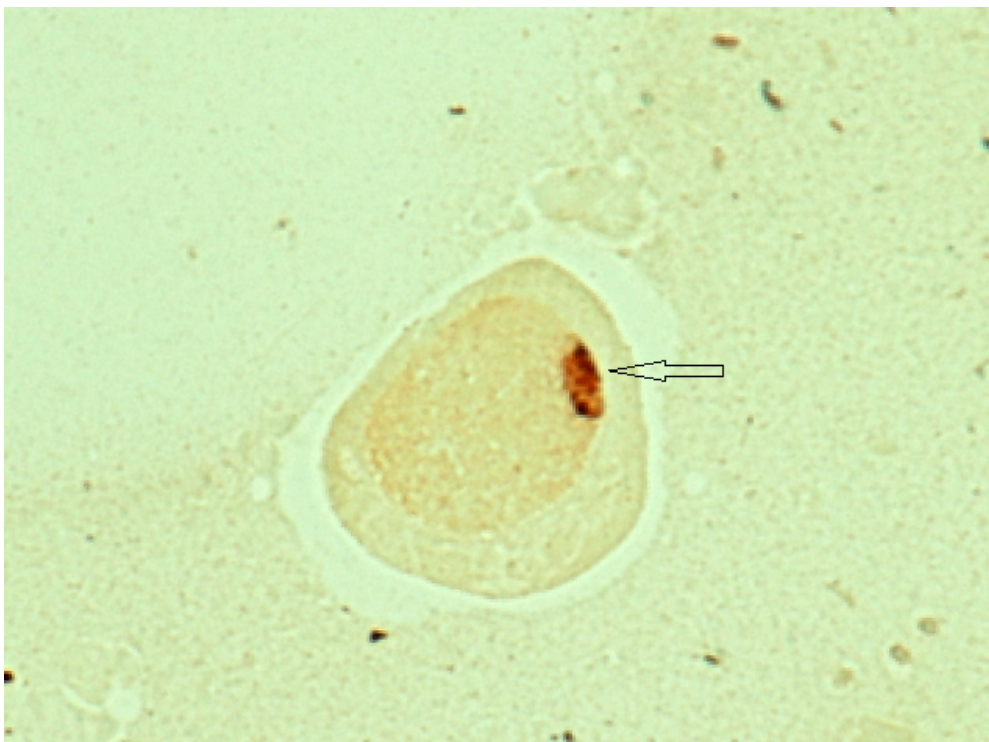
Obr. 8. **Kompaktní jádérko**



Obr. 9. **Prstenčité jádérko**



Obr. 10. Mikrojadérko



Obr. 11. Jadérko obarvené AgNOR

Tab. 1. Velikost jadérek u jednotlivých typů haemocytů

haemocyt	Velikost jadérka ( $\mu\text{m}^2$ )
plasmocyt	$1,74 \pm 0,061^*$
granulocyt	$0,87 \pm 0,059$
prohemocyt	$1,58 \pm 0,089$
adipohemocyt	$0,76 \pm 0,079$
oenocyt	$1,67 \pm 0,325$

\* průměr  $\pm$ SEM

#### 4.4. Morfometrické charakteristiky haemocytů

Obarvené preparáty Pappenheimovo panoptickým barvením jsme podrobili obrazové analýze, kde jsme se zaměřili na velikost buněk a jader (tab. 2). Zjistili jsme, že největší velikost buňky mají eonocyty, zatímco nejmenší velikost jsme naměřili u prohemocytů. Největší velikost jádra mají plasmocyty, které jsou i nejvíce zastoupeny v diferenciálním rozpočtu. Naopak nejmenší velikost jádra mají tvarově netypické adipohemocyty. Největší poměr velikosti jádra a buňky nalezneme u oenocytů, které tudíž obsahují největší množství cytoplasmy v buňce, naproti tomu nejmenší poměr mají prohemocyty. Tato skutečnost je dobře vidět ve světelném mikroskopu; buňka má pouze malý okraj cytoplasmy kolem svého jádra. Dále jsme zjistili pomocí t-testu na hladině významnosti  $2\alpha = 0,05$ , že plasmocyty, prohemocyty a eonocyty jsou statisticky významně odlišné od souborů všech typů haemocytů, naproti tomu granulocyty, adipohemocyty a sferulocyty jsou statisticky významně odlišné pouze od souborů prve jmenovaných, ale nejsou statisticky významně odlišné mezi sebou.

Tab. 2. Velikost buněk a jader u jednotlivých typů haemocytů

haemocyt	velikost buňky ( $\mu\text{m}^2$ )	velikost jádra ( $\mu\text{m}^2$ )	povrch buňky/povrch jádra
plasmocyty	220,89 $\pm$ 5,652 * b, c, d, e, f	71,62 $\pm$ 1,537*	3,10 $\pm$ 0,059*
granulocyty	111,44 $\pm$ 2,412 a, c, e	42,50 $\pm$ 1,053	2,67 $\pm$ 0,059
prohemocyty	52,20 $\pm$ 1,340 a, b, e, d, f	32,83 $\pm$ 0,899	1,60 $\pm$ 0,017
adipohemocyty	112,97 $\pm$ 6,692 <sup>a, c, e</sup>	30,93 $\pm$ 2,149	3,75 $\pm$ 0,164
oenocyty	263,59 $\pm$ 14,574 a, b, c, d, f	39,39 $\pm$ 2,284	6,86 $\pm$ 0,388
sferulocyty	126,57 $\pm$ 1,755 a, c, e	47,20 $\pm$ 1,245	2,68 $\pm$ 0,034

a statisticky významné ve srovnání s počty plasmocytů

b statisticky významné ve srovnání s počty granulocytů

c statisticky významné ve srovnání s počty prohemocytů

d statisticky významné ve srovnání s počty adipohemocytů

e statisticky významné ve srovnání s počty eonocytů

f statisticky významné ve srovnání s počty sferulocytů

\* průměr  $\pm$  SEM

## 5. Diskuze

### 5.1. Odběr hemolymfy

Zatím se v odborné literatuře neobjevila univerzální technika standardního odběru hemolymfy u larválního stádia rodu *Culex*. Nalezli jsme pouze postupy, kdy hemolymfa byla odebrána po odstřížení sosáku dospělého jedince za pomoci zchlazené anestezie (Castillo et al. 2006). Další nalezený postup spočíval v opláchnutí larvy v PBS a imobilizované na ledu po dobu 1-2 minut. Poté se larva probodla s antikoagulačním činidlem II. (Brayner et al. 2005). Zjednodušenou variantou je pouze opláchnutí larvy destilovanou vodou, imobilizace na ledu a rozstřížením trupu mikronůžkami (Silva et al. 2002). Dále byl popsán i postup, kdy se do larvy komára vpravilo pomocí jehly 8–10  $\mu$ l roztoku složeného z 60% Schneiderova media, 10% fetálního hovězího séra a 30% citrátového pufru. Získáno bylo 10-12  $\mu$ l zředěné hemolymfy, ale výsledky dospěly pouze ke čtyřem zmapovaným typům haemocytů (Castillo et al. 2006). Můžeme tedy předpokládat, že tato technika nejspíše nebude vhodná pro zachycení všech typů haemocytů. Co se týče metody zchlazení, je podle našeho názoru pro náš odběr hemolymfy z larvy *Culexu pipiens* nepotřebná, protože larvu lze znehybnit na podložním sklíčku pouhým osušením vody, ve které jsou larvy před odběrem chovány, a za našich laboratorních podmínek by byla tato technika těžko dostupná a proveditelná.

Podle našeho názoru právě nestandardizace odběru z důvodu velikosti a nestandardního množství odebrané hemolymfy z *Culex pipiens* by mohla být největším problémem pro uvedení našeho biomodelu do preklinické části testování.

### 5.2. Klasifikace haemocytů a diferenciální počet

Ke klasifikaci haemocytů jsme použili světelnou mikroskopii doplněnou Pappenheimovým panoptickým barvením, které nám obarvilo strukturu buněk v odstínech barev od červené po modrou. Toto barvení nám bylo velmi nápomocné při klasifikaci, protože různé typy haemocytů po obarvení získaly různé odstíny jader

a cytoplasmy, i když jsme se setkali i s různými odstíny jádra a cytoplasmy stejných typů haemocytů u stejného preparátu, což mohlo to být zapříčiněné různým množstvím hemolymfy v daném místě preparátu, kdy se barvivo nemohlo plně dostat k buňkám. Rozdíly v barvitelnosti jsme zpozorovali i při porovnání více preparátů mezi sebou, ale tyto rozdíly nebyly až tak výrazné, abychom jim přisoudili velký význam.

Porovnali jsme všechny typy haemocytů rodu *Culex* s popisy v odborné literatuře.

Adipohemocyty mají dle popisů různou velikost, kdy se buňky vyznačují ovoidním tvarem s lipidovými a granulárními složkami v cytoplazmě a lze také zahlédnout drsné endoplazmatické retikulum a Golgiho komplex, což poukazuje na syntetickou a sekretoriální činnost buňky (Butt and Shields 1996, Barracco and Loch 1989, Gupta 1979). Tento popis je podle našeho názoru velmi dostačující, pouze bychom doplnili na základě pozorování, že buňky mohou mít výběžky na obou koncích. Při pozorování jsme si povšimli i výrazných granul, bohužel nemůžeme pomocí panoptického barvení dokázat, zda se jedná o lipidy.

Granulocyty mají dle autorů Raina, Akai a Hagopiana (Raina 1976, Akai and Sato 1973, Hagopian 1971) různou velikost a tvar. Jádro je malé a v cytoplazmě se nacházejí stejnotvaré acidofilní inkluze. Některé inkluze mají strukturální charakteristiky melanosomálních nebo premelanosomálních plastidů. V cytoplazmě se také nachází bohatá síť hrubého endoplazmatického retikula. Granulocyty se vyvíjejí z plasmocytů a jejich celkový objem v hemolymfě je od 30 do 65%. Při našem pozorování jsme opravdu narazili na granulocyty různých velikostí, tento jev se nám však nejevil tak významný, abychom je rozdělili do více skupin. Můžeme souhlasit, že v plasmě se vyskytují acidofilní inkluze, které se barví při panoptickém barvení tmavě modře. Bohužel bohatou sítí hrubého endoplazmatického retikula jsme ve světelném mikroskopu, kvůli malé rozlišovací schopnosti, neměli šanci zahlédnout. Celkové zastoupení granulocytů v našich výsledcích se shoduje s výše uvedenými pracemi.

Oenocyty jsou dle popisů v pracích Butta, Wiggleswortha a Locka (Butt and Shields 1996, Wigglesworth 1988, Locke 1969) velké oválné buňky, u kterých



se mohou v acidofilní cytoplazmě nacházet i dvě excentricky uložená jádra. Cytoplasma je hladká a hyalinní. Oenocyty se podílejí na transportu lipidů skrz svoji biomembránu. Během našeho pozorování jsme nenarazili na žádný oenocyt, který by měl dvě jádra, čili s tímto popisem nemůžeme souhlasit. Můžeme pouze souhlasit s oválným tvarem a excentricky uloženým jádrem; pro tyto buňky jsme jako charakteristický znak použili přítomnost vakuol a velikost jádra pro jejich určení.

Plasmocyty dle popisů jsou zastoupeny vždy ve více než 28% z celkového rozpočtu haemocytů u většiny hmyzu. Mají různou velikost a tvar hlavně na rozhraní cytoplazmy. Jádro tvoří kolem 40-50% buňky, v cytoplazmě se nacházejí basofilní granula, hrubé endoplazmatické retikulum a Golgiho komplex (Pech and Strand 2000, Raina 1976, Gupta 1979). S takto uvedeným popisem můžeme souhlasit, pouze přítomnost basofilních granul nebyla vždy dobře viditelná a u některých buněk nebyla granula přítomna. Dále jsme opět neměli možnost vidět hrubé endoplasmatické retikulum a Golgiho komplex, které světelná mikroskopie nezachytí.

Prohemocyty jsou dle autorů Yamashita a Akaie (Yamashita and Iwabuchi 2001, Akai and Sato 1973) nejmenší buňky v hemolymfě. Mají velké jádro a malý pruh basofilní cytoplazmy. V průběhu mitózy se z nich vyvíjí plasmocyty a pravděpodobně i granulocyty. Můžeme pouze dodat, že úzký pruh cytoplazmy se barví dle panoptického barvení tmavě modře. Nalezli jsme také prohemocyty různých velikostí, ale tyto rozdíly nebyly velmi výrazné, proto jsme se nerozhodli tuto skupinu dále dělit. Výskyt velikostních variant může sice podpořit tezi, že z prohemocytů se pravděpodobně vyvíjejí plasmocyty a granulocyty, ale není to přímý důkaz.

Koaguocyty jsou dle publikace Gupty (Gupta 1979) zpravidla malé buňky, které jsou hyalinní, křehké a nestálé. Jádro mají relativně malé a excentricky uložené. Podle tohoto popisu jsme nebyli schopni určit, zda tyto buňky nebyly přiřazeny například k prohemocytům, ale díky předpokládané nestálosti se můžeme domnívat, že tyto buňky jsme neměli šanci v preparátech zahlédnout.

Sferulocyty jsou dle popisů ovoidní buňky obvykle větší než prohemocyty, ale menší než některé plasmocyty. V některých případech jsou sferulocyty zastoupeny okolo 4 %. Cytoplasma obsahuje velké acidofilní inkluze. V některých případech

se mohou sferulocyty vyvinout z prohemocytů (Yamashita and Iwabuchi 2001, Ashhurst 1982). Tento popis se plně shoduje s popisem sferulocytů námi objevených, pouze jejich celkové zastoupení v diferenciálním rozpočtu u našeho biomodelu bylo kolem 1%.

U řádu *Culex* bylo tedy rozlišeno 6 typů hemocytů podle klasifikace nalezené v publikacích Gupty (Gupta 1979) a Braynera (Brayner et al. 2005): plazmatocyty (PL), granulocyty (GR), prohemocyty (PR), adipohemocyty (AD), oenocyty (OE) a sferulocyty (SF). Ačkoliv byly buňky dobře vidět ve světelném mikroskopu, byl v některých případech celkem velký problém správně odlišit některé typy haemocytů. Nejčastěji bylo obtížné rozlišit granulocyty od plasmocytů, i když plasmocyty jsou větší, mohli jsme nalézt i granulocyty podobné velikosti plasmocytů. Jediným rozlišovacím znakem mezi nimi byl odstín cytoplasmy, jelikož granula nebyla vždy zřetelná. Museli jsme však porovnat více buněk v preparátu, abychom si byli jistí, že i odstín souhlasí s daným typem haemocytů. Dále bylo obtížné rozlišit oenocyty a sferulocyty. Kvůli jejich malému zastoupení v hemolymfě jsme měli pouze malou možnost je mezi sebou porovnat. Hlavním rozpoznávacím znakem se stala velikost a uložení jádra v buňce, jelikož bylo velmi snadné zaměnit vakuoly s inkluzemi, které se v buňkách nachází. Nejsnáze jsme rozdiferencovali prohemocyty a adipohemocyty díky jejich typickému tvaru. Prohemocyty jsou nejmenší buňky, které lze v preparátu nalézt, a velikost jejich jádra, které zaujímá více než 2/3 buňky, je velmi specifická, stejně jako velice specifické výběžky a větvenovitý tvar u adipohemocytů. Výběžky někdy dosahují velké vzdálenosti od buňky, ale mohou být i velmi malé. Zásadním znakem ale zůstává větvenovitý tvar, který mají všechny adipohemocyty. Rozlišení jednotlivých typů haemocytů nám u některých preparátů ztížil fakt, že jsme nejspíše při odběru hemolymfy aktivovali srážecí kaskádu způsobující shluk buněk namačkaných na sebe, což nám znemožnilo jejich bližší dourčení. Tento jev se objevil sporadicky a pro srovnávací analýzu byly použity preparáty, kde se tento jev neprojevil.

Při porovnání diferenciálního rozpočtu s údaji v dostupné literatuře, z nichž se naše výsledky nejvíce přiblížily práci Braynera (Brayner et al. 2005), jsme nenašli velké rozdíly. Námi získaný diferenciální rozpočet PL ( $41,9 \pm 2,4\%$ ), GR ( $35 \pm 5,1\%$ ), PR ( $7,8 \pm 1,4\%$ ), AD ( $1,9 \pm 1,2\%$ ), OE ( $2,5 \pm 0,5\%$ ) a SF ( $0,63 \pm 0,5\%$ )

se při porovnání s výsledky Braynera PL (43.4%), GR (40.3%), PR (9.3%), AD (0.8%), OE (4.6%) a SF (1.6%) liší významně pouze u počtu oenocytů, kdy rozdíl při horní hranici je 1,6% . Můžeme si ale povšimnout, že ostatní výsledky odpovídají do hranice 0,2% či se zcela shodují s porovnávanými výsledky. Můžeme tedy předpokládat, že diferenciální rozpočet heamocytů u rodu *Culex* je poměrně stálý.

### 5.3. Barvení jadérek pomocí toluidinové modři a AgNOR

Jelikož dosud nebyla publikována žádná práce, která by zveřejnila výsledky velikostí jadérek u různých typů haemocytů rodu *Culex*, nenabízí se nám tedy možnost vzájemného srovnání. Může to být zapříčiněno tím, že velikost jadérka nebyla považována za signifikantní morfometrický znak, který by mohl být nápomocný k rozlišení haemocytů u našeho biomodelu.

## 6. Závěr

I. Rozlišili jsme šest druhů haemocytů: granulocyty, prohemocyty, sferulocyty, plasmocyty, adipohemocyty a enocyty.

II. Obrazovou analýzou jsme vytvořili morfometrický profil každého typu haemocytu: popsali jsme významné rozdíly mezi velikostí prohemocytu, plasmocytu a enocytu. Obrazová analýza se zdá být velmi nápomocnou metodou při rozlišování různých typů haemocytů, ale hodnocené morfometrické údaje nejsou postačující pro diferenciaci všech buněčných typů bez hodnocení kvalitativních charakteristik.

III. Na základě velikosti jadérek jsme rozdělili haemocyty na další dvě významné skupiny.

IV. Pro posouzení případné možnosti používat haemocyty *C. pipiens* v hematotoxikologii bude ještě potřebné vyřešit otázku standardizace jejich odběru.

## 7. Literatura

Akai, H., Sato, S. (1973): Ultrastructure of the larval hemocytes of the silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae). International Journal of Insect Morphology and Embryology 2: 207-231.

Akai, H., Sato, S. (1977): Surface and internal ultrastructure of the hemocytes in *Lucilia illustris*. Insect hemocytes development, forms, functions and techniques edited by Gupta A. P.. New York: Cambridge University: 145 - 153.

Aladaileh, S., Nair, S. V., Birch, D., Raftos, D. A. (2007): Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*) hemocytes: Morphology and function. Journal of Invertebrate Pathology 96: 48-63.

Araujo, H. C. R., Cavalcanti, M. G. S., Santos, S. S., Alves, L. C., Brayner, F. A. (2008): Hemocytes ultrastructure of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Micron 39: 184-189.

Asgari, S., Schmidt, O. (2003): Is cell surface calreticulin involved in phagocytosis by insect hemocytes?. Journal of Insect Physiology 49: 545-550.

Ashhurst, D. E. (1982): Histochemical properties of the spherulocytes of *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae). International Journal of Insect Morphology and Embryology 11: 285-292.

Barracco, M. A., Loch, C. T. (1989): Ultrastructural studies of the hemocytes of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 84: 171-88.

- Battison, A., Cawthorn, R., Horney, B. (2003): Classification of *Homarus americanus* hemocytes and the use of differential hemocyte counts in lobsters infected with *Aerococcus viridans* var. *homari* (Gaffkemia). *Journal of Invertebrate Pathology* 84: 177-197.
- Beaulaton, J. (1979): Hemocytes and hemocytogenesis in Silkworms. *Biochimie* 61: 157-164.
- Bekoff, M., Gruen, L., Townsend, S. E., Rollin, B. E.(1992): Animals in science: some areas revisited. *Animal Behaviour* 44: 473-484.
- Berger, J. (2003): Ethical conflicts of interest in modern biomedicine. *Journal of Applied Biomedicine* 1: 181–182.
- Berger, J. (2005): Current ethical problems in cell biology. *Journal of Applied Biomedicine* 3: 109–113.
- Berger, J. (2008): Nuclear size in lymphocytes and haemocytes of different species. *European Journal of Histochemistry* 52: 149-152.
- Berger, J., Slavíčková, K. (2008): Morphological Characterization of Hemocytes in the Adult Linden Bug, *Pyrrhocoris apterus* (L.) (Heteroptera). *Zoological Studies* 47: 466-472.
- Bodziocha, S., Ogielab M. R. (2009): New approach to gallbladder ultrasonic images analysis next term and lesions recognition. *Computerized Medical Imaging and Graphics* 33: 154-170.
- Brayner, F. A., Araujo, H. R. C., Cavalcanti, M. G. S., Alves, L. C., Peixoto, C. A. (2005): Ultrastructural characterization of the hemocytes of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Micron* 36: 359–367.

Bush, H., Smetana, K. (1970): *The Nucleolus*. 1st edition. New York: Academic Press: 7 - 8.

Butt, T. M., Shields, K. S. (1996): The Structure and Behavior of Gypsy Moth (*Lymantria dispar*) Hemocytes. *Journal of invertebrate pathology* 68: 1-14.

Castillo, J. C., Robertson, A. E., Strand M. R. (2006): Characterization of hemocytes from the mosquitoes *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and molecular Biology* 36: 891–903.

Crosley, A. C. (1975): The cytophysiology of insect blood cells. *Advance Insect Physiology* 11: 117-221.

Cunha, F. M., Wanderley-Teixeira, V., Teixeira, A. A., Albuquerque, A. C., Alves, L. C., Lima, E. A. (2009): Hemocyte characterization of *Nasutitermes coxipoensis* (Holmgren) (Isoptera: Termitidae) workers and hemocyte evaluation after parasitism by *Metarhizium anisopliae*. *Neotropical Entomology* 38: 293-297.

Da Silva, J. B., De Albuquerque, C. M. R., De Araujo, E. C., Peixoto, C. A., Hurd, H. (2000): Immune defense mechanisms of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: culicidae) against *Candida albicans* infection. *Journal of invertebrate pathology* 76: 257-262.

de Carvalho, M. A. G., Lotufo, R. de A., Couprie, M. (2007): Morphological segmentation of yeast by image analysis. *Image and Vision Computing* 25: 34–39.

Dorn, A. (1978): Ultrastructure of differentiating hemocytes in the embryo of *Oncopeltus fasciatus* Dallas (Insecta, Heteroptera). *Cell & Tissue Research* 187: 479-488.

Eilertsen, J. L., Rrvik, S., Foosns, T., Øye, H. A. (1996): An automatic image analysis of coke texture. *Carbon* 34: 375-385.

Francois, J. (1975): Hemocytes et organe hematopietique de *Thermobia domestica* (packard) (Thysanura: Lepismatidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology* 4: 477-494.

Gardiner, E. M. M., Strand, M. R. (1999): Monoclonal antibodies bind distinct classes of hemocytes in the moth *Pseudoplusia includens*. *Journal of Insect Physiology* 45: 113-126.

Gupta, A. P. (1979): Hemocyte types: their structure, synonymies, interrelationships, and taxonomic significance. *Insect hemocytes*. New York: Cambridge University: 85-127.

Hagopian, M. (1971): Unique structures in the insect granular hemocytes. *Journal of Ultrastructure Research* 36: 646-658.

Haine, E. R., Rolffa, J., Siva-Jothy, M. T., (2007): Functional consequences of blood clotting in insects. *Developmental & Comparative Immunology* 31: 456-464.

Hernandez-Verdun, D. (2004): The nucleolus: functional organization and assembly. *Journal of Applied Biomedicine* 2: 57 - 69.

Hinsby, A. M., Kiemer, L., Karlberg, O., Lage, K., Fausbøll, A., Juncker, A. S., Andersen, J. S., Mann, M., Brunak, S. (2006): A Wiring of the Human Nucleolus. *Molecular Cell* 22: 285–295.

Chen, C. C., Laurence, B. R. (1985): An ultrastructural study on the encapsulation next term of microfilariae of *Brugia pahangi* in the haemocoel of *Anopheles quadrimaculatus*. *International Journal for Parasitology* 15: 421-428.



- Jones, J. C. (1965): The hemocytes of *Rhodnius prolixus* (Stål). Biol Bull 129: 282-294.
- Khanna, S. (1964): The Circulatory system of *Dydercus koenigii* (Hemiptera, Pirrhocoridae). Indian Journal of Entomology 26: 405-410.
- Konukoglua, E., Penneca, X., Clatza, O., Ayachea, N. (2009): Tumor Growth Modeling in Oncological Image Analysis. Handbook of Medical Image Processing and Analysis 2: 305-315.
- Lavine, M. D., Strand, M. R. (2002): Insect hemocytes and their role in cellular immune responses. Insect Biochemistry and Molecular Biology 32: 1237–1242.
- Lea, M. S. (1986): A Sericesthis iridescent virus infection of the hemocytes of the wax moth *Galleria mellonella*: Effects on total and differential counts and hemocyte ontogeny. Journal of Invertebrate Pathology 48: 42-51.
- Levine, M. S., Cepeda, C., Hickey, M. A., Fleming, S. M., Chesselet, M. F. (2004): Genetic mouse models of Huntingtons and Parkinsons diseases: illuminating but imperfect. Trends in Neurosciences 27: 691–697.
- Ling, Q., Wang, Ch., Kariuki, M. M., Kiguchi, K., Ling, E. (2009): Reexamination of the role of hematopoietic organs on the hematopoiesis in the silkworm, *Bombyx mori*. African Journal of Biotechnology 8: 3658-3665.
- Locke, M. (1969): The ultrastructure of the oenocytes in the multiintermolt cycle of an insect. Tissue and Cell 1: 103-154
- Lowenberger, C. (2001): Innate immune response of *Aedes aegypti*. Insect Biochemistry and Molecular Biology 31: 219–229.

Mahilini, H. M., Rajendran, A. (2008): Categorization of hemocytes of three gastropod species *Trachea vittata* (Muller), *Pila globosa* (Swainson) and *Indoplanorbis exustus* (Dehays). *Journal of Invertebrate Pathology* 97: 20-26.

McInerney, T., Hamarneh, G., Shenton, M., Terzopoulos, D. (2002): Deformable organisms for automatic medical image analysis. *Medical Image Analysis* 6: 251–266.

Muta, T., Iwanaga, S. (1996): The role of hemolymph coagulation in innate immunity. *Current Opinion in Immunology* 8: 41-47.

Nappi, A. J., Vass, E., Frey, F., Carton, Y. (2000): Nitric Oxide Involvement in *Drosophila* Immunity. *Nitric Oxide* 4: 423-430.

Paixão, R. L., Schramm, F. R. (1999): Ethics and animal experimentation: what is debated?. *Cadernos de Saúde Pública* 15.

Pech, L. L., Strand, M. R. (2000): Plasmatocytes from the moth *Pseudoplusia includens* induce apoptosis of granular cells. *Journal of Insect Physiology* 46: 1565-1573.

Pech, L. L., Trudeau, D., Strand, M. R. (1994): Separation and behavior in vitro of hemocytes from the moth, *Pseudoplusia includens*. *Cell & Tissue Research*. 277: 159-167.

Pläsier, B., Lloyd, D. R., Paul, G. C., Thomas, C. R., Al-Rubeai, M. (1999): Automatic image analysis for quantification of apoptosis in animal cell culture by annexin-V affinity assay. *Journal of Immunological Methods* 229: 81-95.

Protz, R., Sweeneyand, S. J., Fox, C. A. (1992): An application of spectral image analysis to soil micromorphology, 1. methods of analysis. *Geoderma* 53: 275-287.

Raina, A. K. (1976): Ultrastructure of the larval hemocytes next term of the pink bollworm, *Pectinophora gossypiella* (Saunders) (Lepidoptera: Gelechiidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology* 5: 187-195.

Shelton, D., Stetten, G., Aylward, S., Ibanez, L., Cois, A., Stewart, Ch. (2005): Teaching medical image analysis with the Insight Toolkit. *Medical Image Analysis* 9: 605–611.

Silva, J. E. B., Boleli, I. C., Simões, Z. L. P. (2002): Hemocyte types and total differential counts in unparasitized and parasitized *Anastrepha obliqua* (Diptera, tephritidae) larve. *Brazilian Journal of Biology* 62: 689-699.

Smetana, K. (2002): Structural features of nucleoli in blood, leukemic, lymphoma and myeloma cells. *European Journal of Histochemistry* 46: 125-132.

Strand, M. E., Johnson, J. A. (1996): Characterization of Monoclonal Antibodies to Hemocytes of *Pseudoplusia includens*. *Journal Insect Physiol* 42: 21-31.

Tartes, U., Vanatoa, A., Kuusik, A. (2002): The insect abdomen - a heartbeat manager in insects?. *Comparative Biochemistry and Physiology* 133: 611-623.

Uozumi, N., Yoshino, T., Shiotani, S., Suehara, K. I., Arai, F., Fukuda, T., Kobayashi, T. (1993): Application of image analysis with neural network for plant somatic embryo culture. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 76: 505-509.

Vecht-Lifshitz, S. E., Ison, A. P. (1992): Biotechnological applications of image analysis: present and future prospects. *Journal of Biotechnology* 23: 1-18.

Vincent, L. (1993): Morphological Grayscale Reconstruction in Image Analysis: Applications and Efficient Algorithms. *IEEE Transactions on Image Processing* 2: 176-201.

Wigglesworth, V. B. (1988): The source of lipids and polyphenols for the insect cuticle: The role of fat body, oenocytes and oenocytoids. *Tissue and Cell* 20: 919-932.

Yamashita, M., Iwabuchi, K. (2001): *Bombyx mori* prohemocyte division and differentiation in individual microcultures. *Journal of Insect Physiology* 47: 325-331.

Zapotoczny, P., Zielinska, M., Nita, Z. (2008): Application of image analysis for the varietal classification of barley: Morphological features. *Journal of Cereal Science* 48: 104-110.

## 8. Klíčová slova

AgNOR

*Culex pipiens*

Haemocyty

Morfometrie

Nukleolární koeficient

Obrazová analýza

Pappenheimovo barvení

Toluidinová modř

### Key words:

AgNOR

*Culex pipiens*

Haemocytes

Image analysis

Nucleolar coefficient

Orometry

Pappenheim staining

Toluidine blue