

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZDRAVOTNĚ SOCIÁLNÍ FAKULTA**

**Vyšetření změn fagocytózy pro screening hemotoxicity na modelovém
objektu**

Bakalářská práce

Autor: Martina Jurčová

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

Datum vypracování: 5.8.2008

Anotace

Examination of changes in fagocytosis for the screening of hemotoxicity on a biomodel

Our thesis dealt with the examination of phagocytosis in terms of the study of possibilities of a new biomodel for hemotoxicity testing. Two tests were chosen for the examination that are ordinarily used in laboratory hematology when testing the phagocytosis ability of the leukocytes: 1) observation of phagocytosis in the optical microscope, and 2) NBT test which measures the amount of the reactive oxygen intermediates (ROI) that are capable to kill and decompose foreign particles. In vitro we applied synthetic microspherical hydrophilic particles (MSHP). Before the observation in optical microscope the samples were stained by the Pappenheim staining. The assessment then was carried out so that as the phagocytic cells were addressed those cells which contained at least one MSHP particle entirely within the cell. The results were expressed with the aid of the two parameters: phagocytic activity and phagocytic index, and it were also distinguished between particular types of cells. NBT test was conducted by the method on microarray according to Pick et al. (1981) and spectrophotometer measurement. We assessed 7-10 individuals in each group.

The applied biomodel was *Spodoptera littoralis*. (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae) in the sixth instar and the model substance was Tebufenozide RH 59-92 in the following doses: $1.725 \times 10^{-7} \mu\text{l}$ and $1.725 \times 10^{-6} \mu\text{l}$ per larva in the test of the phagocytic capacity, and $1.725 \times 10^{-6} \mu\text{l}$ and $1.725 \times 10^{-5} \mu\text{l}$ in the test of NBT reduction, administered *per os* in the diet for the period of 8 hours.

Our findings were as follows: we observed a significant increase in the phagocytic capacity after the administration of Tebufenozide in both tests conducted. The increase in the number of phagocytic cells (49.5% intact; 63.4% Teb 1.72), as well as in the increase in the average number of the ingested cells (3.8 intact; 5.4 Teb 0.17) occurred. Also the production of ROI significantly increased in comparison with the control animals. (3.19 intact; 3.79 Teb 1.72). In *S. littoralis* we recognised four types of hemocytes, which are normally identified also in other authors: prohemocytes

(PR), granulocytes (GR), plasmacytes (PL) and spherulocytes (SPH), and further, prohemocytes and granulocytes were distinguished to small and large. A small fraction of hemocytes could not be classified because they morphologically resembled the big GR but by their function they were more similar to PL, and therefore they were included in the separate group designated as the non-classified type of hemocytes. Granulocytes and prohemocytes formed the predominant phagocytic cells (FA about 50%) but the PL and SPH were also phagocytosing (FA below 20%) though only with the lower average number of ingested particles. In the reaction to the administration of Tebufenozide we recorded also the differences between the distinct types of hemocytes which could point at their distinct functions. Except the big PR all the other types of hemocytes increased their phagocytic capacity, among these significantly only GR, conversely the big PR were the single hemocytes that responded with the decrease in the phagocytic activity and index. Our phagocytosis tests documented also the existence of the differences between the sexes. FA did not differ but the values of FI and NBT test were lower in females than in males in all the cases and also statistically approved (FI). For the supplementation of our results we also compared the differential count of the control group with and without the administration of Tebufenozide but no significant changes were discovered although we could observe certain decrease in the proportion of PR and PL and the increase in proportion of GR. We tested two other variations in addition when performing the NBT test: administration of ten times higher dose (Teb 17.3) and the 24 hours period of Tebufenozide administration and it was found out that in the higher dose the toxic effects prevailed– the production of ROI diminishes, whereas after 24 hours administration the production of ROI recuperated. But the significance of this phenomenon is not clear, because the controls have decreased the NBT by this time.

With the use of the applied laboratory methods, our phagocytosis test quite reliably recorded the changes in hemotoxicity induced by the administration of xenobiotics on a given biomodel.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Vyšetření změn fagocytózy pro screening hemotoxicity na modelovém objektu vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce fakultou, a to v nezkrácené podobě 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:

Ráda bych vyjádřila poděkování svému vedoucímu práce panu prof. RNDr. Josefu Bergerovi, CSc. za vedení práce v laboratoři a bakalářské práce, za odbornou pomoc a perfektní osobní přístup. Dále děkuji panu doc. RNDr. Ivanovi Gelbičovi, CSc. z Entomologického ústavu AV ČR za pomoc, poskytnutí experimentálních zvířat a odborných konzultací.

Obsah

1. Úvod	8
2. Současný stav	9
2.1. Imunotoxicita	9
2.2. Screening hemotoxicity	10
2.3. Imunitní systém bezobratlých	12
2.4. Fagocytóza u Lepidopter a bezobratlých	13
2.5. Metody vyšetřování fagocytózy	16
2.6. Klasifikace hemocytů u Lepidopter	18
2.6.1. Problémy a metody klasifikace	18
2.6.2. Třídy hemocytů u Lepidopter	19
3. Cíle práce a hypotézy	23
4. Metodika	24
4.1. Test fagocytární kapacity	24
4.2. Pappenheimovo panoptické barvení	25
4.3. NBT test	25
4.4. Aplikace látky	26
4.5. Statistické zpracování dat	26
5. Výsledky	27
5.1. Morfologie hemocytů	27
5.2. Diferenciální rozpočet hemocytů	28
5.3. Ingesce MSHP	30
5.3.1. Fagocytární aktivita	30

5.3.2. Fagocytární index	32
5.4. NBT test.....	35
6. Diskuse.....	37
6.1. Stanovení klasifikace a diferenciálního rozpočtu hemocytů	37
6.2. Stanovení změn hemotoxicity pomocí fagocytárních testů.....	39
6.2.1. Vyšetření změny DHC.....	39
6.2.2. Vyšetření změn fagocytózy	40
7. Závěr	45
8. Literatura.....	46
9. Klíčová slova	55
10. Seznam použitých zkratk	56
11. Přílohy.....	57

1. Úvod

Četnými studiemi bylo prokázáno, že imunitní systém může být modulován různými látkami a tyto změny mohou vést k akutním i chronickým onemocněním imunitního systému, kterými jsou imunodeficience, tj. onemocnění projevující se vyšší náchylností k infekcím, imunosuprese a s tím související zvýšené riziko nádorových onemocnění a imunostimulace spojené s výskytem alergií a autoimunitních onemocnění. Paradoxně však nebyly ještě donedávna ve většině zemí zákonem dané normy ohledně testování imunotoxicity u různých chemických látek, a tak nebyly vždy známy vedlejší účinky těchto látek na imunitní systém. Látky s imunomodulačními vlastnostmi jsou produkty chemického, potravinářského a farmaceutického průmyslu, především však exogenní škodliviny, které znečišťující životní prostředí a ohrožují stabilitu ekosystému. Postižení imunitních funkcí může vést k akutnímu úhynu živočichů (při imunodeficienci), anebo k dlouhodobému snižování plodnosti a potomstva. Hlavním důvodem, proč byly studie imunotoxicity v minulosti opomíjeny, je relativně nízký výskyt případů onemocnění imunitního systému, který se projevuje jen u jedinců s poruchou obranyschopnosti. Ale takový přístup dnes již není přípustný a také se vlivem přetechnizované společnosti významně zvyšuje incidence těchto onemocnění, a přidává tak na významu této problematice.

Z těchto důvodů se postupně prosadil nový biologicko-medicínský obor imunotoxikologie. V současné době není test imunotoxicity součástí základního testování toxicity, ale jestliže existuje nějaké podezření, že látka moduluje imunitní systém, pak je navrhováno provedení kompletního testu imunotoxicity.

Záměrem naší práce bylo testovat možnosti nového modelového objektu při studiu hemotoxicity, které by bylo možno použít ke komparativním studiím hemotoxicity a jako vhodného experimentálního živočicha pro studium imunomodulačních působení xenobiotik. Rozhodli jsme se pro použití testu fagocytózy, který je jedním z nejhojněji využívaným testem hemotoxicity u bezobratlých a je velmi obvykle považován za velmi dobrý indikátor hodnocení dopadu xenobiotik na změnu imunitních funkcí.

2. Současný stav

2.1 *Imunotoxicita*

Prvotní studie, které dokumentovaly velkou citlivost imunitního systému k poškození podáním toxické látky byly publikovány v 70. letech a na začátku 80. let. (Koller, 2001; Kačmár et al., 1999). Od 80. let se tento obor uchytil mezi ostatními biologickými disciplínami a dále se vyvíjel, takže už dnes není pochyb o jeho důležitosti a sociálním dopadu onemocnění imunitního systému.

V dnešní době se stává chemické znečištění pesticidy a těžkými kovy z emisí hlavní zátěží životního prostředí (Kačmár, 1990; Russo a Madec, 2007). V USA bylo v posledním desetiletí objeveno mnoho složek pesticidů ve veřejných zásobách vody a často ve vyšších než přípustných koncentracích. Chronická toxicita se může projevovat vznikem rakoviny, jaterními a ledvinovým poškozením, poruchami nervového systému, imunitního systému, změnami štítné žlázy, endokrinním rozhozením a vývojovými defekty plodu. (Kohler, 2005) Descotes a Vial (1994) dokazuje, že různé chemické látky mohou způsobovat imunosupresi, imunostimulaci, hypersenzitivitu a autoimunitu u lidí i u zvířat (Fernandes et al., 1999). Při kontaminaci jídal bylo prokázáno, že i nízké dávky vedly během určité doby k poškození imunitních funkcí, které zapříčinilo onemocnění závažnějšími infekcemi a komplikace s tím spojené. (Ilback a Friman, 2007) Dnes již mnohé studie prokazují senzitivitu imunitního systému k množství látek znečišťujících životní prostředí (Dyryndy, 2000; Galloway a Depledge 2001; Harford et al., 2005; Russo a Lagadic, 2000, 2004)

V průběhu několika posledních let se měnily požadavky na preklinické studie testování farmaceutik ve vztahu k imunotoxicitě v EU, Japonsku a Spojených státech. A to ve všech odvětvích týkajících se léků, drog, jídla a všech možných chemikálií.

V roce 2002 byla pořádána Mezinárodní konference harmonizace technických požadavků pro registraci léčiv pro humánní použití (ICH), na níž byl přijat konsenzus týkající se jednotného přístupu k testování imunomodulace, který byl doporučen k implementaci do národních programů. Nový koncept zahrnuje in-depth testing neboli hloubkové funkční testy, které jsou indikovány na základě nějakého důkazu

imunotoxického potenciálu, anebo když jsou cílové populace specificky zranitelné. Nemusí být ale součástí běžných testů. (Schulte a Ruehl-Fehlert, 2006; Hinton, 1992)

Imunotoxikologické studie se zabývají citlivostí imunitního systému, studují míru a druh jeho poškození a srovnávají je mezi různými živočišnými druhy. Jejich cílem je nejen zjištění rozsahu poškození imunitního systému, ale i to, zda by se tento test dal využít jako časný indikátor subklinické imunotoxicity např. u preklinických studií u lidí či jako biomarker znečištění životního prostředí. (Anderson, 1993; Livingstone et al., 2000; Galloway and Depledge, 2001; Fournier et al., 2000). Imunitní systém není scie tradičně považován za cílový orgán toxicity (Holsapple et al., 2003), ale protože je jedním z nejrychleji mobilizovaných obranných mechanismů, bylo navrženo, aby byl používán jako biomarker toxických látek v životním prostředí. (Weeks et al., 1990, 1992; Peakall, 1992, Rousseau et al., 1997; cit. z Russo a Lagadic, 2000) Zbinden (1987) charakterizuje látky, které ovlivňují imunitní systém, jako imunomodulátory. Jsou to nejčastěji látky znečišťující životní prostředí (hlavně pesticidy a průmyslové emise), léky a fyzikální faktory, ale např. i potravinové doplňky.

2.2 Screening hemotoxicity

Imunotoxicitu je možné detekovat různými způsoby. Lze použít různých typů funkčních i nefunkčních testů, které se týkají imunitního systému a jeho součástí. Nefunkčními testy jsou např. ukazatele změn morfologie, počtu hemocytů, histologické preparáty (Germolec, 2004), vyšetření humorálních faktorů a jiné specializované techniky z oblasti genetiky, cytochemie atd. Imunitní systém je také úzce spojen také s nervovým a endokrinním systémem. Funkčními testy jsou vyšetření správného průběhu mechanismů imunitní obrany a funkce jednotlivých typů buněk odpovídajících za imunitní obranu. (Kačmár et al., 1999; Descotes, 2006) Poškození imunitního systému ještě nemusí znamenat zhoršenou funkci imunitního systému díky přirozené redundanci, která je v něm zabudovaná. Ale opačným jevem je fakt, že ani sebemenší imunosuprese nemusí být zanedbatelná, protože může znamenat riziko vzniku nádorového onemocnění.

Je ale nutno brát v potaz, že živé organismy reagují různě na stejnou toxickou látku a podle toho vybrat správný test imunotoxicity. U jednoho druhu nemusí být pozorovány žádné změny, u jiného imunosupresivní účinky a u dalšího imunostimulační účinky dané látky. Nelze ani vybrat jediný živočišný druh, který by byl citlivý na veškerá xenobiotika. (Haley, 2003) Přes veškerou diverzitu existuje také mnoho analogií mezi imunitním systémem bezobratlých a obratlovců. (Fournier et al., 2000) Fournier et al. (2000) se domnívá, že by jakýkoli živočišný druh mohl být použit jako biomarker imunotoxicity a že bude dostatečně přesný k detekci imunomodulace za použití různých typů protokolů. Nejvíce studií imunotoxicity v životním prostředí je prováděno na zvířatech, které jsou považovány za nejcitlivější vůči xenobiotikům v životním prostředí – měkkýších, rybách (Sweet, 2001; Harford et al., 2005) a obojživelnících. Pro výzkum preklinických studií zaměřených na člověka se nejčastěji používají hlodavci. (Smialowicz, 2002; Selgrade, 2007)

Námi vybraným parametrem imunotoxicity byla fagocytární schopnost imunitních buněk, což je velmi důležitá složka obranných mechanismů přítomná jak u obratlovců, tak i bezobratlých, která nabízí možnost komparativních studií. Test fagocytární schopnosti byl obvykle považován za přesný a citlivý nástroj určení hemotoxicity. (Fournier et al., 2006, 2000; Galloway a Depledge, 2001; cit. z Russo a Lagadic, 2004). Odběr vzorků je neinvazivního charakteru, jedná se jen o malé množství periferní krve nebo cirkulující tekutiny. Přestože mají vyšší organismy vyvinuty i specifické obranné mechanismy, je použití nespecifických biomarkerů imunity (funkční testy fagocytujících buněk, NK buněk atd.) výhodným testem např. v terénní práci, jelikož nevyžaduje senzibilizaci zvířat. I přes všeobecně dobré výsledky tohoto testu je vždy třeba znát omezení, která jsou dána jednak typem vybrané látky, variabilitou odpovědí na toxickou látku u různých živočišných druhů a dalšími parametry testu. (Cheby a Sullivan, 1984; Anderson et al., 1992; Coles et al., 1995; Dyrynda et al., 1998; Fournier et al., 2002; cit. z Russo a Lagadic, 2004)

2.3 Imunitní systém bezobratlých

Bezobratlí mají na rozdíl od obratlovců vyvinuté pouze přirozené obranné mechanismy sestávající z buněčné a humorální složky. Funkčně se přirozená imunita u hmyzu nijak neliší imunity u obratlovců. Naopak přirozená imunita u hmyzu je dobře vyvinutá a zajišťuje komplexní a účinnou obranyschopnost.

Buněčnou imunitní odpověď vykonávají hemocyty. Hemocyty existují dvojího typu: cirkulující, které jsou v oběhu (Davenport et al., 1985; Bactor, 1981), a necirkulující, které jsou přisedlé na různých orgánech (Wigglesworth, 1974; Lackie, 1988). Dnes již víme, že za různých podmínek se mohou přisedlé buňky uvolňovat do oběhu a zvyšovat tak počet cirkulujících hemocytů. Kromě toho existují ještě hemocyty fixní, ale ty se funkčně, morfologicky i svým původem zcela liší od přisedlých hemocytů.

Buněčnou odpovědí na antigen je fagocytóza, enkapsulace a nodulace (Boman a Hultmark, 1981; Strand a Pech, 1995) a produkce důležitých imunologických faktorů, které mají rozpůzňovací komunikační a efektorové funkce. (Götz a Boman, 1985). Důležitou úlohou hemocytů je dále sekrece koagulačních faktorů, detoxifikace (Lavine a Strand, 2001, 2002), hojení ran a utváření tkání (Lackie, 1988), přenos (Ribeiro et al., 1996) a metabolismus různých látek (Gupta 1979; Wigglesworth, 1959).

Humorální obrana zahrnuje produkci antimikrobiálních peptidů (Bulet, 1999; Borgis, 1999; Lowenberger, 2001), reaktivních intermediátů kyslíku a dusíku (Bogdan et al., 2000; Vass a Nappi, 2001) a komplex enzymatických kaskád, které regulují koagulaci a melanizaci hemolymfy (Muta a Iwanaga, 1996; Gillespie et al., 1997; cit. z Lavine a Strand, 2002, 2001). Jedná se o různé látky typu rozpoznávacích molekul, opsoninů, komunikačních a cytotoxických látek a látek regulujících imunitní odpověď, např. adhezivitu a lokomoci buněk. Zdrojem humorálních látek jsou hemocyty a tukové tělísko. (Lowenberger, 2001) Podle Karpa (1996) mají hlavní úlohu v mikrobiální ochraně lysozymy.

Imunitní systém bezobratlých má schopnost rozpoznávat cizí antigeny a rozlišovat mezi nimi. Za rozpoznání antigenních struktur odpovídají jak buněčné povrchové receptory, tak i humorální molekuly. Dokazuje to mnoho studií. Např.

Lemaitre et al. (1997) zjistil, že při kontaktu hemocytů s antigenem dochází k rychlé expresi genů kódujících tvorbu antimikrobiálních peptidů, které jsou specifické pro daný typ mikroba.

Imunitní systém u člověka je nejčastěji modelován studiemi na hlodavcích, ale jsou testovány i jiné živočišné druhy včetně hmyzu a bezobratlých. Modelovými objekty studujícími fyziologii Lepidopter jsou nejčastěji *Manduca sexta*, *Pseudopleusia includens* a *Bombyx mori* (Strand, 2008), ale bylo provedeno i mnoho studií na druhu *Spodoptera littoralis*.

2.4 Fagocytóza u Lepidopter a bezobratlých

Většinou je fagocytóza považována za hlavní složku přirozených imunitních mechanismů, jejíž úlohou je odstraňovat mikroorganismy a vlastní apoptotické buňky. (Silverstein, 1995; Fadock a Chimini, 2001; Kurtz, 2002; cit. z Borges, 2007) Testy fagocytózy slouží ke zhodnocení stavu přirozené imunity, nicméně pozorování změn fagocytózy je u lidí považováno jen za orientační vyšetření funkce fagocytů, který musí být doplněn dalšími testy. Navíc jsou defekty fagocytózy u lidí poměrně vzácným onemocněním. (Pávková, 2003)

Fagocytujícími buňkami u hmyzu jsou cirkulující i přisedlé hemocyty (Crossley, 1975; Lackie, 1988). Fagocytóza má několik fází podobně jako u obratlovců. Zahrnuje rozpoznání receptory na povrchu fagocytů, adhezi, ingesci a destrukci částice (Bang, 1975; Ratcliffe a Rowley, 1979). Jedná se o složitý komplex dějů, které vyžadují velkou energetickou spotřebu. Fagocytóza vyvolává jednak konformační změny v cytoplazmatické membráně a cytoskeletu, jejichž výsledkem je zanoření částice do buňky a vytvoření fagosomu, jednak vyvolává tvorbu cytotoxických látek, které částici usmrtí a rozloží.

Fagocytóze obvykle předchází rozpoznání, opsonizace a chemotaxe cizího agens za účasti dalších buněk a imunologických faktorů. Pohlčené mikroorganismy jsou zabíjeny nitrobuněčně uvolňovanými látkami, jako např. lysozomálními degradačními enzymy, reaktivní kyslíkaté a dusíkaté intermediáty (ROI a RNI) a další látky. (Adema et al., 1991; Anderson, 1994) Mechanismy zabíjení se liší u různých druhů a u

některých tyto látky naprosto chybí. U mlžů bylo prokázáno oxidativní vzplanutí v důsledku aktivity NADPH oxidázy (Adema et al., 1993) a u Lepidopter byl také detekován superoxid (Ahmad et al., 1991; Bergin et al., 2005). Je známa NO aktivita u hmyzu (Weiske a Wiesner, 1998, 1999), u komára (Luckhart, 1998) i u Lepidopter (Weiske a Wiesner, 1999) Whitten and Ratcliffe (1999) detekuje zvýšení hladiny reaktivních kyslíkatých a dusíkatých intermediátů u švába *Blaberus discoidalis* po infekci.

U Lepidopter jsou aktivními hemocyty hlavně GR a v menší míře pak i PL (Neuwirth, 1974; Brehélin a Hoffmann, 1980; cit. z Lavine a Strand 2002). Ostatní typy buněk většinou za fagocytující považovány nejsou. U *S. littoralis* byly pozorovány jako hlavní fagocytující buňky též GR (Costa et al., 2005), které běžně obsahovaly až sedm pozřených částic.

Co se týče PL, není zcela jasné, do jaké míry se podílí na fagocytóze. Někteří autoři dokonce popírají, že PL fagocytují (Ratcliffe a Rowley, 1975; Tojo et al., 2000; Ling a Yu, 2006), jiní jsou přesvědčeni, že fagocytují (Akai a Sato 1973; Neuwirth 74; Beaulaton, 1979) Costa et al. (2005), Brehélin a Hoffmann (1980) a Ribeiro a Brehélin (2006) pozorovali fagocytózu jen u malého počtu PL, s maximálním počtem dvou zfagocytovaných částic. Ribeiro a Brehélin (2006) se domnívá, že důvodem odlišných výsledků jsou pravděpodobně rozdílné podmínky experimentů, které mají vliv na množství pohlceného materiálu.

Existují ještě další rozdíly mezi fagocytózou GR a PL. Ling a Yu (2006) jasně prokázali, že GR dokážou fagocytovat jakékoli částice, jak inertní, tak biologické, ale PL fagocytují jen inertní částice. Yokoo et al. (1995) a Tojo et al. (2000) zase prokázali, že u *G. mellonella* PL neobklopovaly malé částice, ale jen částice větší než 5 mikrometrů. Schopnost PL fagocytovat tedy závisí na velikosti, typu částice a dalších podmínkách experimentů, které někdy neznáme. (Ribeiro a Brehélin, 2006)

Bylo zjištěno, že někdy se vyskytují významné rozdíly mezi vnímavostí pohlaví u stejného druhu v expozici, toxikokinetice a odpovědi na chemikálie. Většinou tomu nebyla věnována pozornost, ale existuje několik studií, které jasně dokazují, že rozdíly mezi pohlavími vedly ke snížení reprodukce a nestabilitě populace. Mohou způsobit

destabilizaci uvolnění gamet u bezobratlých, změny v endokrinním a neuroendokrinním systému u obratlovců. (Burger, 2007). Díky těmto zaznamenaným případům by měla být věnována pozornost také odlišnostem mezi pohlavími.

Fagocytózu a další imunitní odpověď mohou vyvolat jak biotické, tak abiotické partikule (Wiesner et al., 1996). Naměřená fagocytární aktivita závisí na typu cizorodých částic, jejich velikosti, množství a na čase inkubace. (Ratcliffe a Walter, 1983). Fagocytóza může být pozitivně ovlivněna indukací s imunologickými faktory, protože působí opsonizaci a chemotaxi a stimulována různými látkami typu zymogenu atd. (Bílej a Větvička, 1990; Wiesner a Gótz, 1993). Ale i samotným stykem s povrchem cizorodé částice je aktivována fagocytóza.

Vlivem různých povrchů umělých mikročástic na fagocytózu se zabývali Wiesner (1992), Wiesner a Gótz (1993), Lavine a Strand (2001), Burešová (2002), Dikkeboom et al (1998a), Berger (1988). K testům fagocytózy jsou nejčastěji používány syntetické abiotické partikule, např. latexové, polystyrénové či hydroxymetakrylátové hydrofilní (HEMA) partikule, anebo živé či usmrcené bakteriální kultury, teplem inaktivované kvasinky aj. mikroorganismy, anebo částice uhlíku, karmínové nebo indické barvivo (inkoust), zymosan či kadmium (Bílej a Větvička, 2005; Kind, 2005) Výhody umělých metakrylátových částic (HEMA) udává Berger (1988): Nepoškozují buňky, eliminují adsorpci na různé jiné povrchy díky chemické čistotě a negativnímu povrchovému náboji, jsou všechny stejné velikosti a dobře viditelné. K internalizaci cizorodých částic obvykle dochází velmi rychle, po 3-5 minutách (Costa et al., 2005).

Dlouhou dobu byly prováděny testy fagocytózy u hmyzu pouze in vivo, protože in vitro docházelo k černání (melanizaci) hemolymfy na vzduchu. Až po objevení vhodných fixačních médií byly používány také testy in vitro. In vivo jsou testované částice injikovány do těla hmyzu, zatímco in vitro je inkubována hemolymfa nebo suspenze hemocytů spolu s testovanými částicemi, případně jsou testované částice přetaženy přes zhotovené preparáty hemocytů (Rowley a Ratcliffe, 1976a, cit. z Pávková). Ribeiro et al.(1996) se zabýval porovnáním fagocytárních testů in vivo a in vitro a zjistil, že jsou výsledky obou srovnatelné. V současné době jsou prováděny oba typy testů, jak pro srovnání, tak i proto, že testy in vitro pro některé živočišné druhy

nejsou vhodné z důvodu malé velikosti hemocytů, nízké koncentrace hemocytů a objemu hemolymfy.

Hemolymfa se fixuje chemicky (vhodnými fixačními médii a fyziologickými roztoky), nebo tepelně (ponořením hmyzu do horké vody) (Burešová, 2002)

Citlivost testu fagocytózy byla vícekrát prokázána. Kurtz (2002) studoval individuální rozdíly ve fagocytární aktivitě a vyvinul mikrometodu, kterou je možné detekovat fagocytózu opakovaně a velmi přesně a citlivě.

V humánní medicíně se vyšetření fagocytózy (phagotest) inertních partikulí provádí jen k orientačnímu stanovení změn fagocytární aktivity. Často bývá prováděn spolu s testem oxidativního vzplanutí (burst test), který indikuje metabolickou aktivitu imunitních buněk, chemotaxe či mikrobicidní aktivity (Bartůňková a Šedivá, 2001, cit. z Pávková, 2003)

2.5 Metody vyšetřování fagocytózy

Existuje velký počet fagocytárních testů, které jsou založeny na různých metodách hodnocení fagocytózy. Kromě testů změn fagocytární schopnosti jsou používány testy poškození fagocytů a snížení jejich počtu. Výsledkem může být jak imunodrese, tak imunosuprese. Testy fagocytární schopnosti jsou následující.

Pozorování fagocytózy pomocí testovaných částic je možné ve světelném mikroskopu, fázovém kontrastu, v transmisním a skenovací elektronovém mikroskopu. Testované částice mohou být obarveny (např. Pappenheimovou barvením, trypanová modř), nebo označeny fluorescenčními sondami (např. FITC, PI, EB a další) (Rohloff, 1994) Hodnocenými parametry ve fluorescenční mikroskopii je velikost píku, která určuje relativní fagocytární aktivitu, a intenzita fluorescence píku, která určuje relativní fagocytární index. (Lee, 2000)

Průtokové cytometrie je využíváno k přístrojovému stanovení počtu fagocytujících buněk na základě různých parametrů. (Jansen, 2001) Barvením trypanovou modří a akridinovou oranží je možné rozlišit pohlcené a jen adherované částice (Bílej a Větvíčka, 2005).

Baktericidní testy hodnotí schopnost zabít mikroorganismy – cytotoxickou aktivitu, jsou považovány za klasický standard fagocytárních testů. Používá se např. vitální barvení trypanovou modří a krystalovou violetí atd. Anebo schopnost pohlcovat mikroorganismy - metoda plakování měří počet zbylých bakterií po fagocytóze.

Testy, které hodnotí metabolickou aktivitu imunitních buněk, jsou testy produkce reaktivních kyslíkatých intermediátů (ROI). K určení těchto látek jsou používány látky schopné redukce a změny zbarvení, např. NBT (nitroblue tetrazoliová sůl), INT (jódnitrotetrazoliové soli). Toto měření může být provedeno na mikrodestičce.

Dalším testem, který je běžně klinicky používán, je měření chemiluminiscence, která je vyzařována při tvorbě ROI. Po zesílení přirozené chemiluminiscenční aktivity se používají luminofory a měření je prováděno na scinitlačním spektrofotometru. Metoda je dnes opět již vylepšena k použití mikrodestičky, která umožňuje paralelní použití více stimulans a luminoforů a přesnější monitorování. (Bílej a Větvička, 2005) Existuje ještě mnohem větší škála specializovaných fagocytárních testů, např. použití molekulárních sond (Bílej a Větvička, 2005), test radioaktivity bakterií, který měří rozdíl před a po fagocytóze.

Nepodařilo se mi nalézt metody, které by srovnávaly jednotlivé testy fagocytózy, kromě práce Jansen (2001) a Bjerknes (1984). Jansen (2001) porovnával dva fagocytární testy. Srovnával o mnoho jednodušší test fagocytózy měřený na průtokovém cytometru s klasickým baktericidním testem podle Romeo-Steiner et al. (), která je považována za zlatý standard měření fagocytární kapacity. Výsledky se většinou signifikantně shodovaly, ale přesto byly mezi testy rozdíly. Baktericidní test byl podstatně citlivější, zatímco test fagocytózy metodou průtokové cytometrie byl rychlejší, jednodušší, bezpečnější, obešel se bez použití antibiotik a nedával falešně pozitivní výsledky. Výběr metody, která má být zvolena, tedy závisí na požadavcích daného testu. Bjerknes (1984) hodnotí ty stejné testy a považoval jejich výsledky za rovnocenné.

Stejně metody, které jsou uvedeny v této práci, jsou často použity v klinických měřeních a použili je ve svém výzkumu např. Kabbur (1991), Slapničková a Berger (2002), Rook a Steel (1985), Kačmár a Pistl (1999).

Výběr metod vyšetření imunitního systému je sice veliký, ale je vždy třeba uvážit, které z metod jsou vhodné pro daný typ vyšetření. Optimální vyšetření by mělo splňovat tyto kritéria: být jednoduché, rychlé, bezpečné a standardizovatelné, co nejvíce specifické a citlivé a při provedení by mělo spotřebovat minimum testovaného materiálu, být levné a ideálně také předvídat působení látky u člověka. (Jansen 2001) Samozřejmě neexistuje žádné vyšetření, které by splňovalo všechny tyto požadavky, ale musí splňovat ty kritéria, která jsou prvořadá.

Luster et al. (1992, 1994) poukazuje na to, že stačí dva nebo tři testy k predikci imunotoxicity u myši. Ale je vždy nutná kombinace více testů, přestože většina testů byla relativně dobrými indikátory. Jako relativně špatně indikátory hodnotí proliferativní odpověď liposacharidů a celkové počty leukocytů. Jeho pozitivním závěrem je, že existují dobré korelace mezi změnami v imunitních testech a změně rezistence hostitele, vždycky se změny v rezistenci projeví také v jednom nebo více testech imunity. Na druhou stranu ale v některých případech byly pozorovány změny v imunitních testech bez vlivu na rezistenci. Z pozitivity testu ani nelze spolehlivě určit, zda se pozorované změny projeví celkovým snížením obranyschopnosti. (Luster et al., 1994) Vysvětlením tohoto jevu je, že schopnost rezistence závisí na stupni imunosuprese a množství infekčního agens (Luster et al., 1994) a přirozená redundance v imunitním systému. (Kunder, 2004)

Kačmár et al. (1999) ovšem upozorňuje na omezení testů z krevních buněk, kterým je, že nereflktují všechny změny funkce imunitního systému a týká se různých interakcí s jaterním, endokrinním a nervovým systémem.

2.6 Klasifikace hemocytů u Lepidopter

2.6.1 Problémy a metody klasifikace

Mezi pozorováními různých autorů se zvláště historicky objevovaly velké nesrovnalosti v popisovaných třídách hemocytů, počtu, morfologii a funkci hemocytů. U Lepidopter panuje dnes již dostatečně velká shoda v klasifikaci hemocytů a také názory na původ hemocytů se víceméně shodují. V poslední době se studie častěji zaměřovaly na sjednocení názvů a zobecnění morfologických znaků pro jednotlivé typy

hemocytů (Hartenstein, 2006), anebo alespoň o srovnání hemocytů mezi různými druhy a řády hmyzu.

Příčinou různých výsledků je většinou použití jiných metod pozorování a laboratorních postupů. Přesto se setkáváme také s velkými rozdíly u stejných i blízce příbuzných druhů, které jsou výsledkem velké přirozené strukturní a funkční variability, která je u hmyzu charakteristická. (Cotter a Wilson, 2002) Je prokázáno, že imunitní systém hmyzu má schopnost se za určitých podmínek přizpůsobit vnějšímu prostředí (Šíma a Větvička, 1993).

Největším problémem je zřejmě použití odlišných metod a technik pozorování hemocytů a různých podmínek experimentu. Neexistuje žádná univerzální technika, která by přesně určovala typy hemocytů, ale např. Ribeiro a Brehélin (2006) věří, že kombinací více postupů dosáhne správného určení typu hemocytů.

Hemocyty můžeme třídit podle morfologie, buněčných a antigenních znaků, cytochemických reakcí, fyzikálních vlastností a chování - např. v monovrstvách, nebo podle funkce (Strand, 2008). Nejčastěji je klasifikace prováděna pomocí světelné mikroskopie, TEM (transmisní elektronová mikroskopie) a SEM (skenovací elektronová mikroskopie), použitím fluorescenční mikroskopie, průtokové cytometrie či monoklonálních protilátek. Ribeiro a Brehélin (2006) udává, že opravdu nejlepším rozlišovacím znakem by bylo sledování signálních cest, které jsou aktivovány během diferenciací hemocytů (Lebestky et al., 2000; Alfonso a Jones, 2002; Duvic et al., 2002).

2.6.2 *Třídy hemocytů u Lepidoptera*

Klasifikace hemocytů, kterou zde uvádím, se odkazuje na nejnovější literaturu, a nezabývá se historickým vývojem, který jí předcházel.

U většiny řádů hmyzu včetně Lepidoptera jsou nejčastěji pozorovanými typy cirkulujících hemocytů – prohemocyty (PR), plazmatocyty (PL), granulocyty (GR), oenocyty (OEN) a sferulocyty (SF), jejichž klasifikace vychází z Brehélin a Zachary (1986) (Lavine a Strand 2002; Costa et al., 2005; Ribeiro a Brehélin, 2006) Výjimkou je

např. řád Diptera, který má vyvinuté zřejmě jiné typy hemocytů. (Ribeiro a Brehélin, 2006)

Prohemocyty jsou buňky, které jsou většinou považovány za prekurzorové buňky diferenciováných hemocytárních typů. U některých druhů Lepidopter nebyly pozorovány. (Strand, 2008) Jsou to malé kulaté buňky s velkým nukleolárně-cytoplazmatickým indexem a nevyzrálými cytoplazmatickými organelami.

Plazmatocyty jsou kulaté nebo oválné buňky velikosti do 20 μm , někdy protáhlé do vřetenovitého tvaru. Jejich cytoplazma většinou postrádá granula, má středně vyvinuté hrubé endoplazmatické retikulum a jen málo vyvinutý Golgiho aparát. (Rowley a Ratcliffe, 1981) Vytváří dlouhá a široká lamelipodia. V monovrstvách se po několika minutách inkubace asymetricky adherují na povrchu podložního sklíčka a zploštělé vykazují charakteristický vzhled, který je odlišuje od GR. (Ribeiro a Brehélin, 2006). U plazmatocytů je velmi často pozorována velká variabilita tvarů. (Akai a Sato, 1976)

Funkcí PL je tvorba kapsulí okolo cizích těles, které jsou příliš velké, aby byly zfagocytovány, anebo nodulí okolo velkého množství bakterií a nekrotizujícího melanizovaného materiálu, in vivo. Svými působky indukují apoptózu GR. (Pech a Strand, 2000) Dále tvoří bazální membránu abdominální epidermis při svlékání a uvolňují do prostředí různé látky. (Ling a Yu, 2006). Úloha PL ve fagocytóze je sporná (viz dále).

Granulocyty jsou kulaté buňky 5-8 μm v průměru, které obsahují množství různých inkluzí a granulí. Ve fázovém kontrastu se jeví jako velmi refraktivní buňky. V monovrstvách se silně adherují na povrch a symetricky se na něm rozprostírají. (Strand et al., 2006) Mají vyvinuté hrubé ER a množství pinocytotických váčků a často také mnoho tenkých a dlouhých pseudopodií.

Granulocyty jsou považovány za profesionální fagocyty. Vykazují fagocytózu in vivo stejně jako in vitro, fagocytují všechny druhy bakterií i inertních částic, a to obvykle ve velkém množství. Při fagocytóze také uvolňují obsah svých granulí do prostředí. Jejich granula obsahují různé látky charakteru opsoninů, cytotoxických látek aj. Dále se GR účastní se enkapsulace a nodulace, kde jako první přicházejí do kontaktu

s cizím tělesem. (Akai a Sato, 1973; Ratcliffe a Gagen, 1977; Schmit a Ratcliffe, 1977) Exocytózou svých inkluzí potom uvolňují látky, které buď přitahují PL do místa zánětu (Gillespie et al., 1997), anebo mají alespoň funkci v pomáhání vystavění kapsule či nodule. (Pech a Strand, 1996)

Oenocyty neboli oenocytoidy jsou velké buňky o průměru do 25 μ m, oválného tvaru, s nízkým nukleolárně-cytoplazmatickým poměrem. Obsahují organely neoddělené membránou o různě nízké elektronové hustotě. Jsou to velmi křehké buňky a in vitro brzy ve vzorku lyzují a mizí do několika minut (Strand a Noda, 1991). U *S. littoralis* byly pozorovány jako mizející během minut 3 min (Ribeiro a Brehélin, 2006). Předpokládá se, že tyto hemocyty se účastní melanizace hemolymfy, protože obsahují prekurzory fenoloxidázových enzymů. Jejich obsah je uvolňován do hemolymfy při jejich lýze (Dokke, 1988; Iwama a Ashida, 1986; Drif a Brehelin, 1993; Essawy et al., 1985).

Sferulocyty jsou kulaté menší buňky, které obsahují velké inkluze, tzv. sferule. Většinou je lze dobře rozeznat a od granulocytů přeplněných fagocytovaným materiálem je lze dobře odlišit. (Ribeiro a Brehélin, 2006) Některé studie se domnívají, že SF mají nějakou úlohu v metamorfóze (Ribeiro et al., 1996; Ribeiro a Brehelin, 2006), anebo že transportují kutikulární komponenty. (Sass et al., 1994). Jejich funkce není ještě zcela prokázána.

Další typy hemocytů: Kromě těchto základních buněk se vyskytují u různých druhů i další formy hemocytů. U některých druhů lze pozorovat velmi dlouhé a úzké hemocyty zvané vermiformní buňky nebo podocyty. Většinou bývají považovány za speciální druh plazmatocytů. Ribeiro a Brehélin (2006) ale poukazuje na to, že tento závěr ještě musí být ověřen, protože funkčně se od plazmatocytů liší.

Costa et al. (2005) a Ribeiro a Brehélin (2006) pozorovali u *S. littoralis* další typ hemocytů, velké buňky obsahující množství denzních granulí, avšak odlišných od GR a SF. Costa et al. (2005) je nazval velkými granulocyty. V pozorováních u příbuzného druhu *S. frugiperda* takové buňky pozorovány nebyly. (Ribeiro a Brehélin, 2006)

Existuje snaha ostatní méně časté typy hemocytů zařazovat pod větší podskupiny GR a PL (Huxham a Lackie, 1988; Sokolova et al., 2000). Např. Gupta

(1991) zařazuje vzácně se vyskytující buňky - podocyty, trombocyty, vermicyty a lamelocyty mezi variantní formy plazmatocytů, anebo Sokolová (2000) zahrnuje SF mezi specializované formy GR. Ale není to univerzální řešení, protože může opomíjet důležité rozdíly mezi těmito buňkami.

3. Cíle práce a hypotézy

- Cílem naší práce bylo testovat možnosti nového biomodelu při studiu hemotoxicity, které by bylo možno použít jako experimentálního živočicha *Spodoptera littoralis* pro studium imunomodulačního působení xenobiotik a ke komparativním studiím hemotoxicity.
- Provedenými vyšetřeními jsme chtěli určit diferenciální rozpočet *S. littoralis* a fagocytární kapacitu jednotlivých typů hemocytů.
- Naším cílem bylo porovnání výsledků skupin kontrolních zvířat a zvířat, kterým byl aplikován Tebufenozide. Předpokládali jsme, že Tebufenozide zvýší fagocytární kapacitu hemocytů (Fuigeruido, 2006)

4. Metodika

4.1 Test fagocytární kapacity

Vpichem pod panožku byla larvám odebrána kapka hemolymfy (cca 50 μ l) na parafilm. Odtud bylo pipetováno 20 μ l hemolymfy do mikroskopavek a přidáno 10 μ l pufované suspenze mikrosférických hydrofilních partikulí MSHP v PBS (1:1), která byla připravena podle návodu v kitu (MSHP kit, ARTIM s.r.o.). Směs byla opatrně promíchána a inkubována při 37°C po dobu 20 minut. Poté byly směsí provedeny nátěry na podložní skla a po vyschnutí preparátů byly panopticky obarveny podle Pappenheima. Délku inkubace jsme stanovili z těchto variant - 20, 40, 60 a 120 minut. Nejoptimálnější se nám jevila dvacetiminutová inkubace, protože po delší době docházelo ve větší míře k rozpadu buněk a zároveň míra fagocytózy již dále nerostla.

Hotové vzorky byly pozorovány ve světelném mikroskopu podle Sakalová (1995) a hodnoceny podle následujících kritérií. Byl proveden diferenciální rozpočet hemocytů a odečten počet fagocytujících buněk a počet zfagocytovaných částic v buňce, které byly vyjádřené jako fagocytární aktivita a fagocytární index.

Fagocytární aktivita vyjadřuje procentuální podíl fagocytujících buněk. Výpočet byl proveden podle vzorce: počet fagocytujících buněk/ počet všech vyšetřovaných buněk, vyjádřeno v procentech.

Fagocytární index vyjadřuje průměrný počet pohlčených částic v jedné fagocytující buňce. Vzorec: počet pohlčených částic/ počet vyšetřovaných fagocytujících buněk.

Jako fagocytující byla hodnocena každá buňka, která obsahovala alespoň jednu MSHP částici. Částice adherované jen na povrchu, anebo částečně pohlčené nebyly považovány za zfagocytované. Bylo také rozlišováno, o jaký typ hemocytů se jedná. Hodnoceno bylo vždy minimálně sto buněk v každém vzorku. Ve skupině bylo hodnoceno podle možností 7-10 zvířat.

V rámci testování fagocytózy byl proveden pokus se třemi různými typy fyziologických roztoků (PBS, Ringerův roztok, fenylthiomocovina rozpuštěná ve směsi s Ringerovým roztokem), kterými jsme chtěli předejít melanizaci hemolymfy in vitro. Za nejvhodnější byl vybrán Ringerův fyziologický roztok pro hmyz.

Fotografická dokumentace byla pořízena na mikroskopu Nikon eclipse 50i, se zvětšením objektivu 100x a s použitím počítačového softwaru Nis Elements AR 2.30 (LUCIA).

4.2 Pappenheimovo panoptické barvení

Vysušené roztěrové preparáty byly barveny v May-Grünwaldově roztoku po dobu 6 minut, poté byly propláchnuty na 1 minutu v destilované vodě. Nakonec byly vzorky barveny roztokem Giemsa-Romanovského a vody v poměru 1:3 po dobu 30 minut a opláchnuty proudem tekoucí vody a usušeny. Toto barvení může být různě upraveno s ohledem na charakter barveného materiálu tak, aby měl fialovou barvu a v mikroskopu byly rozlišitelné struktury buněk v různých odstínech fialové. Toto barvení je zároveň i fixačním prostředkem, a proto nevyžaduje jinou fixaci hemolymfy.

4.3 NBT test

Námi použitá metoda redukce NBT vychází z mikrometody podle Picka (Pick et al., 1981), které je prováděno na mikrodestičce a je měřeno spektrofotometrem. Účinkem produktů reaktivního oxidativního systému (ROS) při fagocytóze se bezbarvý NBT redukuje na nerozpustný modročerný formazan, které je viditelné po rozbití fagocytů.

Od každého zvířete byla odebrána hemolymfa stejným způsobem jako dříve. Do jamek mikrotitračního panelu bylo pipetováno v tripletech po 25 μ l hemolymfy a inkubováno s 25 μ l 0,1% (1mg/ml) roztoku NBT (Sigma, 68H5075) v Ringerově roztoku¹ pro hmyz. Další triplet obsahující hemolymfu a Ringerův roztok v poměru 1:1 sloužil jako negativní kontrola. Inkubace trvala 20 minut při teplotě 37°C. Poté bylo přidáno 60 μ l 2M roztoku KOH a 70 μ l dimetylsulfoxidu (DMSO) do každé jamky (Rook et al., 1985), čímž byl nerozpustný formazan solubilizován. Vzniklý produkt byl měřen spektrofotometricky na ELISA readeru (Sunrise, Tecan) při vlnové délce 620 nm. Výsledek byl vyjádřen jako rozdíl oproti negativní kontrole. Negativní kontrola

¹ Ringerův roztok je fyziologický roztok, který se používá jako kultivační médium. Byl vyvinut roku 1882 fyziologem Sidney Ringerem.

neobsahal směs KOH a DMSO. Získané hodnoty znázorňovaly absorbanci vzorků, která je přímo úměrná množství redukováného černého barviva a tedy i produkci ROI.

4.4 Aplikace látky

Tebufenozide RH 59-92 byl podán per os larvám v šestém instaru. Zvířata byla z počátku ponechána hladovění po dvě hodiny, poté byly krmeny osm hodin dietou (Premix, Stonefly Industries Inc.). Tebufenozide byl obsažen v dietě v koncentracích 0,1 μl , 1 μl a 10 μl / 20g diety. Kontrolní zvířata byla krmena dietou bez obsahu Tebufenozidu. Půl hodinu po krmení byly provedeny odběry hemolymfy. Při průměrné spotřebě jednoho zvířete 150 μg diety za 8 hodin a koncentraci Tebufenozidu 23% byly dávky látky podané v dietě spočítány na 0.1725×10^{-6} μl , 1.725×10^{-6} a 17.25×10^{-6} μl na zvíře. V tab. 1 je uveden přehled dávek Tebufenozidu a jejich označení (viz dále v textu). Kontrolní skupinou byla skupina bez účinné látky v dietě, již byly provedeny stejné testy jako aplikovaným skupinám.

V testu fagocytární kapacity byly aplikovány skupiny Teb 0,17 a Teb 1,7. V NBT testu jsme aplikovali larvám Tebufenozide ve vyšších dávkách : Teb 1,72 a Teb 17,2. V testu NBT redukce jsme ještě zkoumali účinek látky na produkci ROI po 24 hodinách v nejvyšší dávce oproti kontrolám.

Tab. 1: Dávka aplikované látky na jedno zvíře pro testované skupiny.

Skupina	Koncentrace [μl]
Teb 0,17	$1,725 \cdot 10^{-7}$
Teb 1,7	$1,725 \cdot 10^{-6}$
Teb 17,3	$1,725 \cdot 10^{-5}$

4.5 Statistické zpracování dat

Výsledky jsou vyjádřeny jako průměrná hodnota skupiny \pm směrodatná odchylka průměru. Statistické hodnocení bylo provedeno oboustranným Mann-Whitneyovým U testem na hladině významnosti 0,05.

5. Výsledky

5.1 Morfologie hemocytů

Ve světelném mikroskopu po panoptickém barvení byly ve vzorcích pozorovány tyto typy hemocytů: malé a velké prohemocyty (mPR, vPR), malé a velké granulocyty (mGR, vGR), plazmatocyty (PL), sferulocyty (SF) a pak jeden odlišný typ hemocytů připomínající z části plazmatocyty a granulocyty. Morfologie hemocytů nebyla vždy jednotná, ale objevovaly se různé varianty velikostí, tvarů buněk a jejich barvitelnosti mezi různými jedinci ve skupině.

Prohemocyty byly pozorovány jako buňky se světlejším zbarvením cytoplazmy a světlým růžovým jádrem s jemnou strukturou popraskané zázvoroky. Velké kulaté jádro vyplňuje většinu buňky a je uloženo centrálně. Struktura buňky je jemná, nediferencovaná, bez typických granulocytárních granulí a vakuol. Buňky se vyskytují ve více velikostech s individuálními rozdíly mezi jedinci, přes malé, středně malé až po velké prohemocyty. Nejvíce však bylo zastoupeno prohemocytů střední velikosti, které byly zařazovány do skupiny malých prohemocytů. Výjimečně, jen u dvou jedinců z 30 vyšetřovaných zvířat, se vyskytly zvláštní nadprůměrně velké prohemocyty. Jednalo se o hemocyty samce a samice.

Granulocyty byly pozorovány jako buňky většinou malé velikosti, s malým tmavším jádrem, které je méně zřetelné kvůli cytoplazmě, která obsahuje různá granula. Granula nebyla vždy patrná, a proto rozpoznávacím znakem zůstávalo tmavší fialové zbarvení jádra i cytoplazmy. Někdy kvůli tmavšímu obarvení vzorku bylo těžké rozlišovat granulocyty od prohemocytů. V menším množství se vyskytovaly také velké granulocyty, které byly podobné strukturou, ale byly větší velikosti.

Dalším typem pozorovaných buněk byly plazmatocyty. Charakteristické jsou velkým obsahem cytoplazmy a relativně velkým jádrem, které často obsahuje chromatinová granula. Mají nejčastěji protáhlý vřetenovitý tvar, s dvěma nebo více výběžky, některé formy byly delší, protáhlejší – hád'átkovité. V literatuře se uvádí, že mohou mít i kulatý nebo vejčitý tvar, ale ty jsme nebyly schopni morfologicky rozlišit od jiných hemocytů a námi rozpoznány nebyly.

Posledním pozorovaným typem byly sferulocyty. Buňky charakteristické velkým množstvím kulatých sferulí různých velikostí, které téměř nebo zcela zastíňují malé jádro. Velikost těchto buněk se často liší, my jsme zaznamenali jen malé sferulocyty.

Kromě uvedených buněk byl zvlášť klasifikován další typ buněk připomínající velikostí a tvarem velký granulocyt, avšak bez patrných cytoplazmatických granulí, jinak připomínající kulatý plazmatocyt vnitřní strukturou jádra (obsahující chromatinová granula) a cytoplazmy.

5.2 Diferenciální rozpočet hemocytů

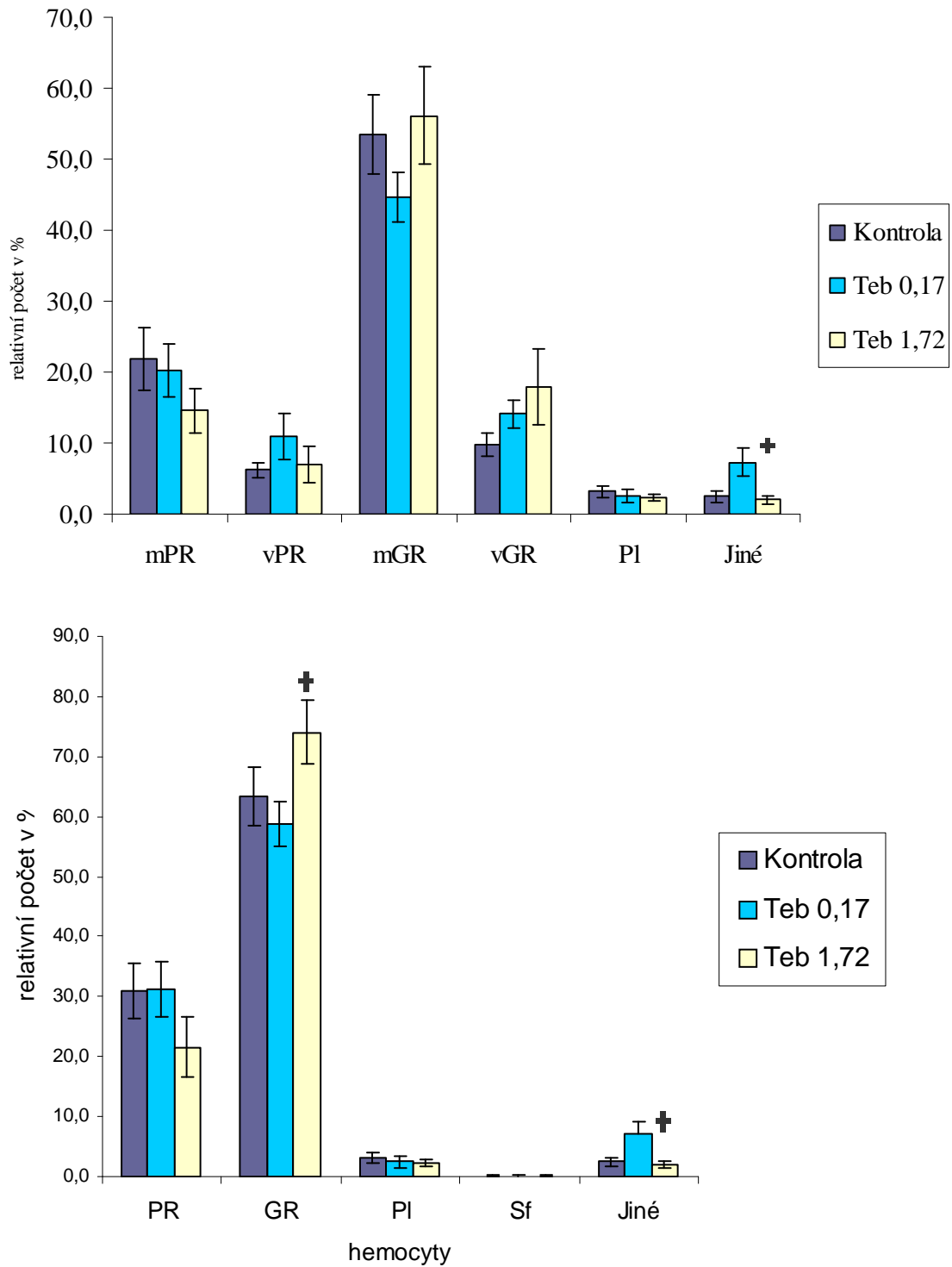
Naším úkolem bylo sledovat zastoupení jednotlivých typů hemocytů neboli diferenciální rozpočet (DHC= differential hemocyte count) ve skupinách bez aplikace (kontrola) a s aplikací Tebufenozidu (Teb 0,17 a Teb 1,72). Přestože byla pozorována značná variabilita DHC mezi jednotlivými larvami, zjištěné rozdíly nebyly nikdy statisticky významné.

Podle našich výsledků byly buňky zastoupeny podle četností takto: nejvíce bylo granulocytů (63,3%), dále prohemocytů (31,0%), nejméně pak plazmatocytů (3,2%) a ostatních buněk jen 2,4%. Z toho malých granulocytů bylo pozorováno 53,6% a velkých granulocytů jen 9,8%, malých prohemocytů 21,8% a velkých prohemocytů také jen 6,2%. Byly zastoupeny spíše malé formy GR a PR. Sferulocyty byly pozorovány jen výjimečně, a proto byly v dalších testech vynechány.

Skupiny Teb 0,17 a Teb 1,72 nevykazovaly statisticky významné odchylky DHC proti kontrole kromě skupiny neklasifikovaných buněk. Přesto naše výsledky ukazovaly na určité změny v DHC a směr působení Tebufenozidu, které zde uvádíme. Změny četností jednotlivých typů hemocytů jsou znázorněny na obr. 1.

Snížil se počet PR (31% na 21,6%), především mPR (21,8% na 14,6%). A naopak počet GR se zvýšil (63,3% na 74%), a to hlavně u vGR (9,8% na 17,9%). Počet PL se mírně snížil (3,2 na 2,3%). Neklasifikované buňky vykazovaly statisticky významnou odchylku mezi skupinami Teb 0,17 (7,3%) a Teb 1,72 (2,0%)

Mezi pohlavími žádné statisticky významné odchylky zjištěny nebyly.



Obř. 1: Diferenciální rozpočet hemocytů *S. littoralis*.

* znamená signifikantní rozdíl mezi kontrolou a hvězdičkou označenou aplikovanou skupinou Teb 0,17, příp. Teb 1,72.

+ znamená signifikantní rozdíl mezi aplikovanými skupinami Teb 0,17 a Teb 1,72 .

5.3 Ingesce MSHP

Fagocytární schopnost hemocytů jsme hodnotili dvěma indexy – fagocytární aktivitou a fagocytárním indexem. Byly použity dvě dávky Tebufenozidu, přičemž u vyšší dávky nebylo možné získat relevantní výsledky u skupiny samců, a proto nebylo možné v této skupině hodnotit výsledky rozdílů mezi samci a samicemi.

5.3.1 Fagocytární aktivita

Jako fagocytující hemocyty byly pozorovány malé a velké granulocyty, malé a velké prohemocyty, plazmatocyty a neklasifikované hemocyty.

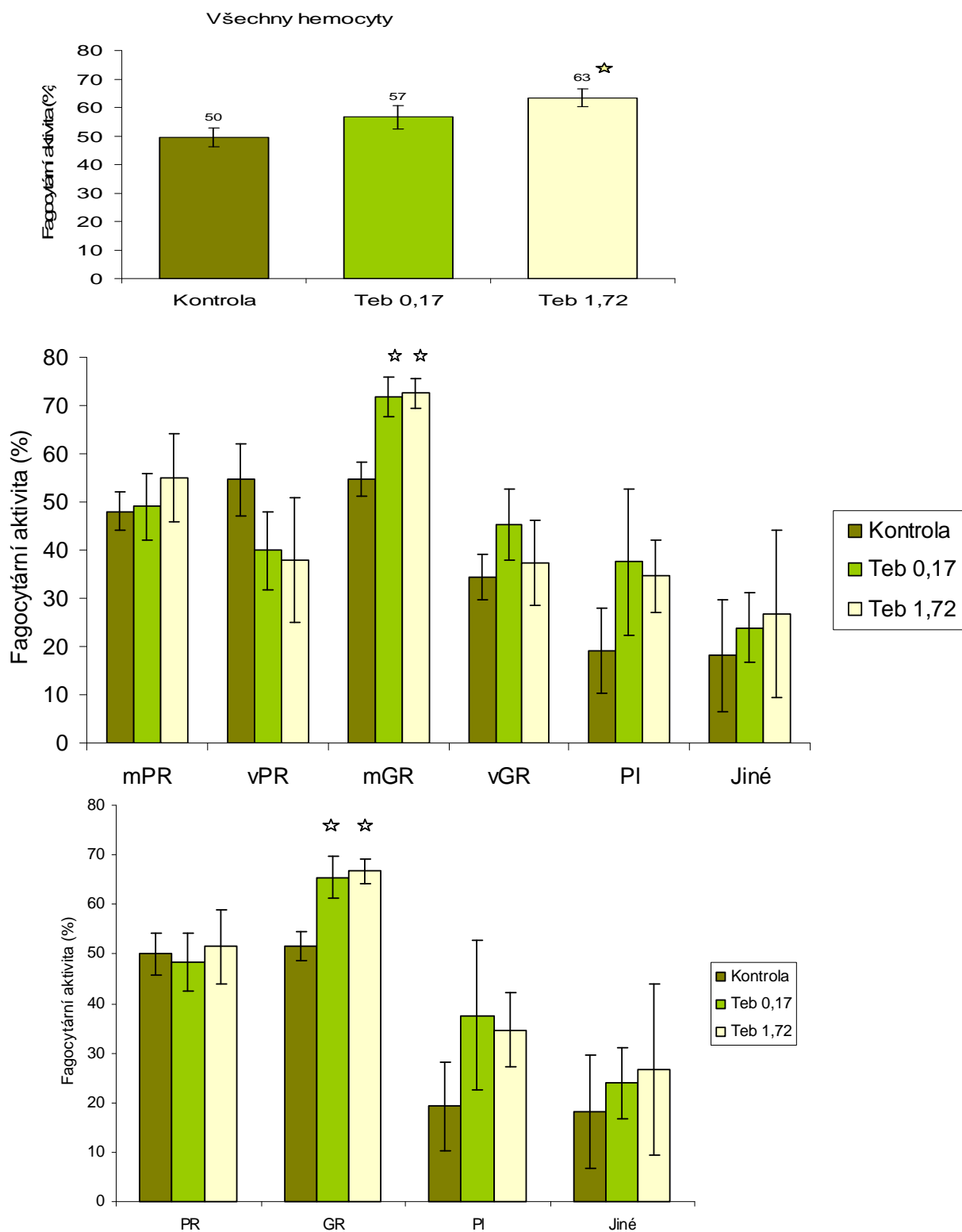
Fagocytární aktivita (FA) je vyjádření pro procentuální podíl těch buněk, které fagocytují. FA jednotlivých typů hemocytů u intaktní skupiny byla: GR (51,6%), PR (50%), PL (19,2%), neklasifikované buňky (18,1%).

Po aplikaci Tebufenozidu byl zaznamenán signifikantní nárůst fagocytární aktivity oproti kontrole. Vzrostl počet fagocytujících buněk z 49,5% (intaktní) na 63,4% (Teb 1,72). Signifikantní byl nárůst ve skupině granulocytů (51,6%; 65,4%; 66,7%)¹, a to obzvláště ve skupině malých granulocytů: (54,6%; 71,8%; 72,6%).

FA ostatních typů hemocytů se po aplikaci Tebufenozidu od kontrol statisticky významně nelišila. FA prohemocytů kolísala okolo 50% (50%; 48,3%; 51,5%). FA mPR mírně vzrostla (48%; 49%; 55%), FA vPR klesla (54,7%; 39,9%; 37,9%), FA Pl vzrostla (19,2%; 37,6%; 34,7%), FA neklasifikovaných buněk vzrostla (18,1%; 23,9%, 26,7%). Kromě velkých prohemocytů bylo tedy zjištěno zvýšení FA u všech typů pozorovaných a hodnocených hemocytů.

Rozdíly mezi pohlavími nebyly statisticky signifikantní.

¹ Pozn.: Čísla v řadě za sebou udávají hodnoty testu pro tyto skupiny resp.: Intaktní; Teb 0,17; Teb 1,72



Obr. 2: Ingesce MSHP partikulí: Fagocytární aktivita hemocytů *S. littoralis*.

* znamená signifikantní rozdíl mezi kontrolou a hvězdičkou označenou aplikovanou skupinou Teb 0,17, příp. Teb 1,72.

+ znamená signifikantní rozdíl mezi aplikovanými skupinami Teb 0,17 a Teb 1,72 .

5.3.2 Fagocytární index

Fagocytární index (FI) vyjadřuje průměrný počet pohlcených částic v jedné fagocytující buňce.

Po aplikaci Tebufenozidu se FI všech buněk signifikantně zvýšil, ale s vyšší dávkou už nevzrostl: (3,8; 5,4^{*}; 5,4)^{1,2}. FI granulocytů signifikantně vzrostl oproti kontrole v obou skupinách, ale ve vyšší dávce Teb 1,72 už se nezvýšil (3,4; 5,6^{*}; 5,4^{*}). Zvýšil se FI malých (3,4; 5,4^{*}; 5,1) i velkých granulocytů (4,6; 5,8; 5,5^{*}), přičemž při vyšších dávkách v obou případech měly nižší FI.

FI prohemocytů narůstal, ale výsledky nebyly statisticky rozdílné (4,7; 5,2; 6,4), FI mPR vzrostl (3,6; 4,7; 5,6), ale FI vPR se snížil (7; 5,8; 5,2).

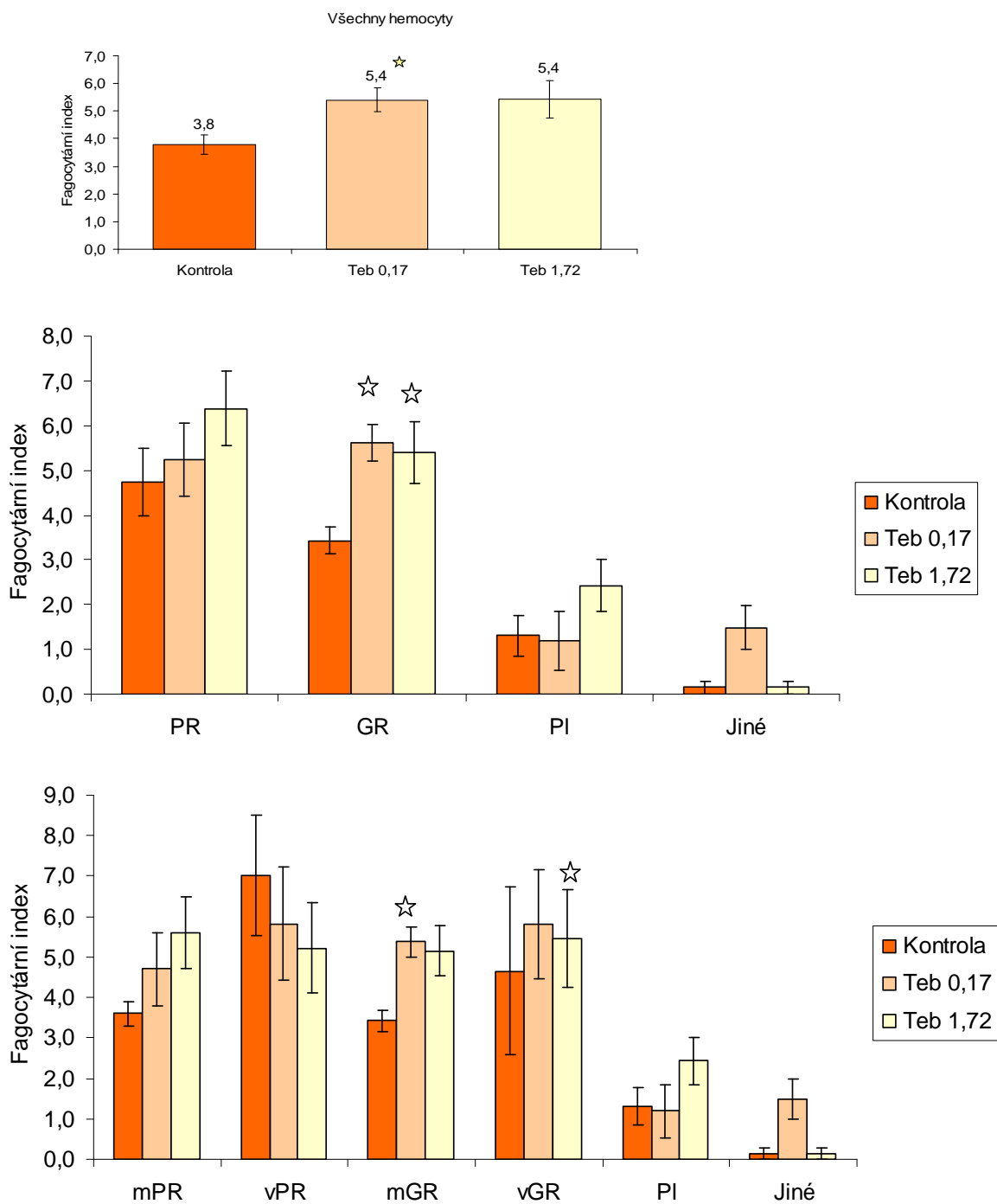
Hodnoty FI plazmatocytů a neklasifikovaných buněk byly v průměru nižší než FI PR nebo GR a jejich hodnoty kolísaly a nevykazovaly žádný určitý trend.

Mezi pohlavími byly zaznamenány signifikantní rozdíly. Samice měly FI u všech tří skupin (3,0[°]; 4,5[°]; 4,8)³ nižší než samci (4,8[°]; 6,8[°]; -). Všechny typy prohemocytů a granulocytů jeví tyto odchylky, nižší FI u samic než u samců, u mGR a vGR statisticky významné. Naopak u plazmatocytů a neklasifikovaných buněk byly FI vyšší u samic.

¹ Pozn.: Symbol hvězdy u čísla (*) značí statisticky významnou hodnotu oproti kontrole.

² Pozn.: Čísla v řadě za sebou udávají hodnoty testu pro tyto skupiny resp.: Intaktní; Teb 0,17; Teb 1,72.

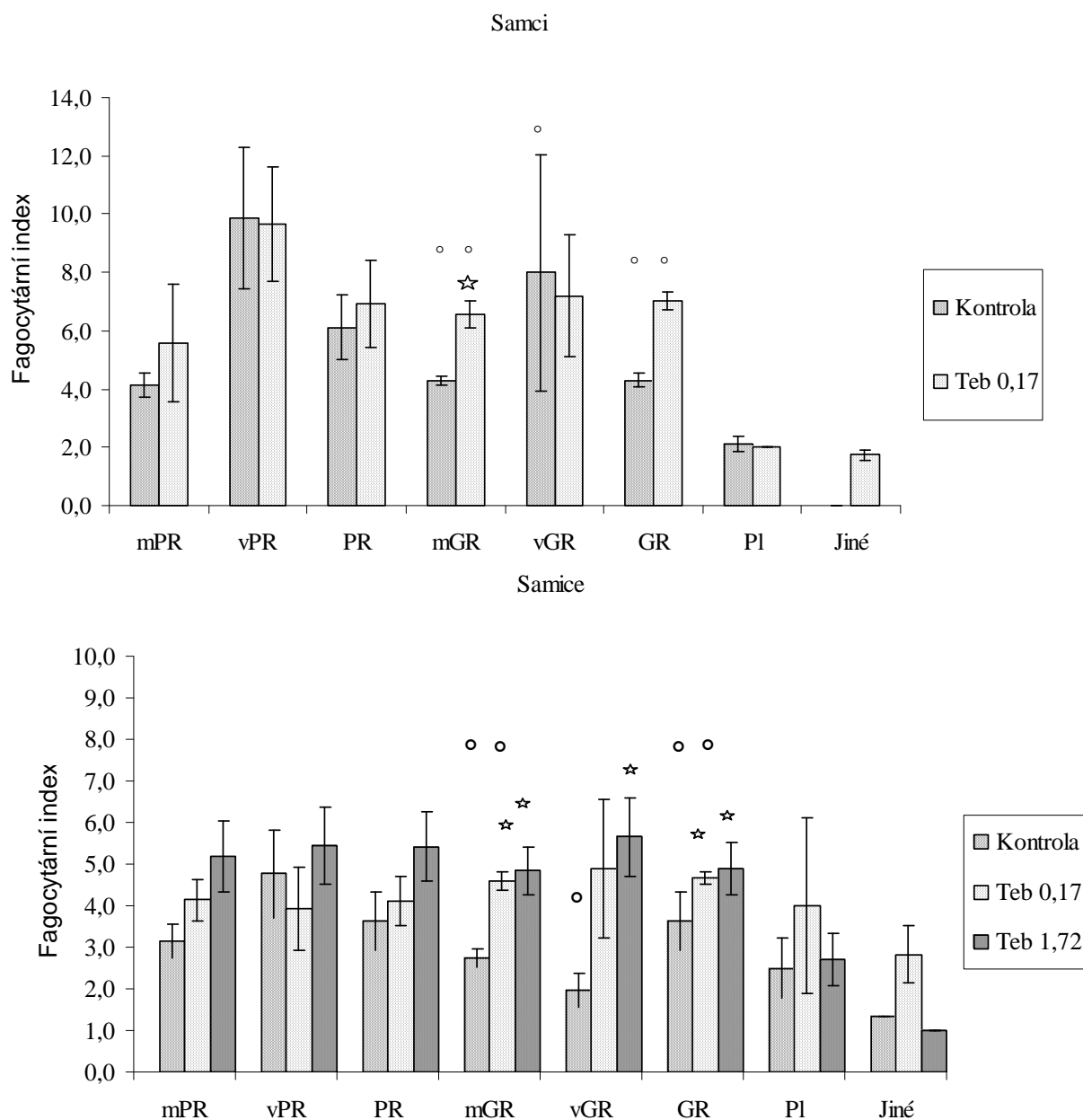
³ Pozn.: Symbol hvězdy u čísla (°) značí statisticky významnou hodnotu mezi pohlavími.



Obr. 3.: Fagocytární index hemocytů *S. littoralis* po aplikaci Tebufenozidu.

* znamená signifikantní rozdíl mezi kontrolou a hvězdičkou označenou aplikovanou skupinou Teb 0,17, příp. Teb 1,72.

+ znamená signifikantní rozdíl mezi aplikovanými skupinami Teb 0,17 a Teb 1,72 .



Obr. 4: Fagocytární index hemocytů *S. littoralis* po aplikaci Tebufenozidu. Rozdíly pohlaví.

- * znamená signifikantní rozdíl mezi kontrolou a hvězdičkou označenou aplikovanou skupinou Teb 0,17, příp. Teb 1,72.
- + znamená signifikantní rozdíl mezi aplikovanými skupinami Teb 0,17 a Teb 1,72 .
- ° znamená signifikantní rozdíl mezi pohlavími

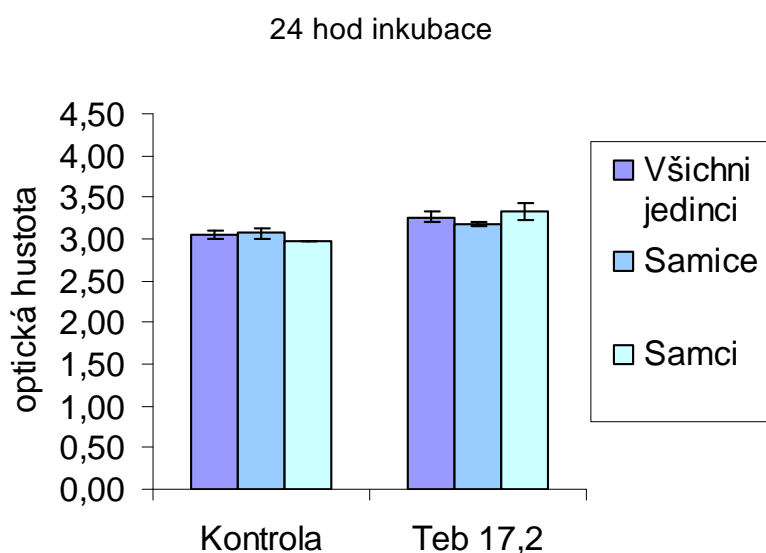
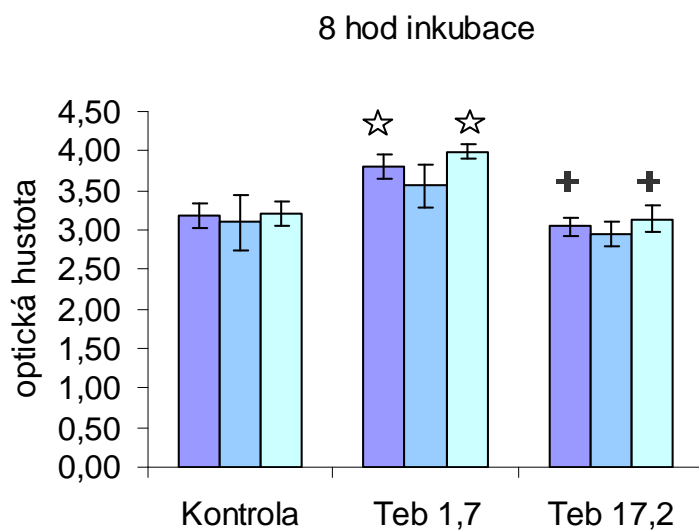
5.4 NBT test

Hodnoty NBT testu udávají optickou hustotu redukovaných tetrazoliových solí, která je přímo úměrná množství produktů ROS u vyšetřovaných hemocytů.

Pro tento test jsme zvolili vyšší koncentrace aplikované látky - skupiny Teb 1,7 a Teb 17,3. Nižší dávka vykazovala statisticky významné zvýšení indexu proti kontrole z $3,19 \pm 0,16$ na $3,79 \pm 0,15$. Vyšší dávka vykazovala nižší hodnoty NBT ($3,05 \pm 0,15$) proti kontrole ($3,19 \pm 0,16$), ale ne statisticky významný. Rozdíl mezi NBT hodnotou vyšší a nižší dávky byl však statisticky signifikantní.

Mezi pohlavími nebyly naměřeny signifikantní rozdíly, přesto samice vykazovaly vždy nižší hodnoty než samci ve stejné skupině.

Skupinu s vyšší dávkou jsme testovali navíc ještě po 24hodinové inkubaci. Po této době jevíly larvy známky toxického působení Tebufenozidu. Larvy přestávaly přijímat potravu, byly malé, skomírající, larvy ztrácely zbarvení, epidermis byla tenká a spontánně se trhala. Jedna larva byla mrtvá. Hodnoty NBT nebyly statisticky významně odlišné, ale přesto se lišily. Po 24 hod byl index nižší u kontrol (*8hod* – $3,19 \pm 0,16$; *24hod* – $3,05 \pm 0,05$) a naopak se zvýšil u skupiny Teb 17,2 (*8hod* - $3,05 \pm 0,12$; *24hod* - $3,27 \pm 0,07$).



Obr. 5: NBT test hemocytů *S. littoralis*.

* znamená signifikantní rozdíl mezi kontrolou a hvězdičkou označenou aplikovanou skupinou Teb 0,17, příp. Teb 1,72.

+ znamená signifikantní rozdíl mezi aplikovanými skupinami Teb 0,17 a Teb 1,72 .

6. Diskuze

6.1 Stanovení klasifikace a diferenciálního rozpočtu hemocytů

Ke klasifikaci hemocytů bylo použito mikroskopického studia vzorků barvených klasickým hematologickým barvením podle Pappenheima, který barví strukturu buněk do různých odstínů fialové. Barví tmavěji jádro a orgány a světlejší je cytoplazma. Buňky mají někdy zřetelnou cytoplazmatickou membránu a někdy nezřetelný okraj.

U *S. littoralis* byly rozlišeny 4 typy hemocytů podle klasifikace Brehelin a Zachary (1969): granulocyty (GR), prohemocyty (PR), plazmatocyty (PL) a sferulocyty (SF). Oenocyty jsme ve vzorcích nenašli, protože jsou to nejcitlivější hemocyty, které se rozpadají *in vitro* a zcela ze vzorků mizí během několika minut (cca 3 min) (Costa et al., 2005).

Přestože byly buňky dobře viditelné, bylo celkem velkým problémem je správně mezi sebou odlišit. Tak jsme postupně mohli zaměnit některé formy PR, PL a GR mezi sebou. Např. nelze spolehlivě rozlišit PR od kulatých PL, protože oba typy buněk jsou si morfologicky velmi podobné. Jsou to středně velké buňky, mají relativně velká jádra, ovšem liší se v poměru jádra k cytoplazmě a ve struktuře jádra. Těžké je také klasifikovat buňky, které neadherovaly a jejich struktura je špatně patrná. Při tmavším obarvení buněk je možná záměna malých PR a GR. Je-li GR obsahují méně granulí např. po degranulaci (Pelc, 1985; Ratcliffe, 1996), je také možné je zaměnit za PL. Ribeiro a Brehélin (2006) pozoruje změny morfologie GR po více než šesti hodinách inkubace, které spočívají v tom, že se většina granulí ztrácí.

Kromě toho byl pozorován jeden typ buněk, který připomínal velké GR, ale neobsahoval granule a strukturou jádra se podobal PL, a proto nebyl zařazen do žádné skupiny hemocytů a hodnocen jako neklasifikovaný typ hemocytů. Protože naše metoda nemohla rozlišit tyto buňky, ponechali jsme je raději v samostatné skupině a později byly pozorovány zajímavé výsledky co se týče jejich fagocytární schopnosti, která naznačuje, že se jednalo pravděpodobně o PL.

Sferulocyty jsme pozorovali jen sporadicky. Sferulocyty jsou to také značně nestabilní buňky, které se rozpadají již několik minut po manipulaci *in vitro*. Pro jejich

malý počet jsme sferulocyty nezařadili do této studie, a proto ve výsledcích s nimi dále není pracováno.

Hemocyty *S. littoralis* byly studovány v pracích Stettler et al. (1998), Ribeiro a Brehélin (2006), Costa et al. (2005), Gelbič et al. (2006), Brillard (2001), které všechny použily klasifikace od Brehelin a Zacharyho (1986) (Da Silveira et al., 2003; Arnold, 1982). V pracích Costa et al. (2005) a Ribeiro a Brehelin (2006) je popisován ještě šestý typ hemocytů, který dříve nebyl klasifikován, a označili jej jako velké granulocyty. Jsou to velké buňky obsahující četné kulaté inkluze nepodobající se ani PL ani GR. Takovéto buňky nebyly v našem pozorování zaznamenány. Naše metoda panoptického Pappenheimova barvení byla použita jen v práci Gelbič et al. (2006), ve které ale nebylo prohemocyty vůbec možné rozlišit podle daných kritérií a byly pravděpodobně zahrnuty do nejpočetnější skupiny PL. PR se v uvedených pracích vyskytovaly jen sporadicky, narozdíl od naší práce, kde jsme pozorovali zhruba třetinové zastoupení prohemocytů.

Ještě jiným důvodem rozdílů mezi pozorováními různých autorů může být značná hereditární variabilita, která je typická u hmyzu a která se vyskytuje dokonce i mezi zvířaty stejného druhu (Arnold, 1982) ve tvaru, velikosti nebo struktuře hemocytů. V rámci naší studované skupiny nebyly zaznamenány žádné signifikantní rozdíly, protože se jedná o jeden chov, ale určité individuální rozdíly jsme pozorovali. Většina GR a PR byly buňky malé a střední velikosti, ale vyskytovaly se mezi nimi i velké formy GR a PR, a dokonce byly výjimečně zaznamenány i obří typy PR, které byly významně větší než kterékoli jiné buňky. PL se vyskytovaly ve více morfologických variantách, většinou byly vřetenovitého tvaru, ale zaznamenali jsem i protáhlé formy až tvaru háďátek, anebo s více než dvěma výběžky. Naopak kulaté formy PL jsme nedokázali naší metodou rozlišit od ostatních hemocytů.

U intaktních hemocytů *S. littoralis* byl stanoven následující diferenciální rozpočet hemocytů (DHC): GR (63,3%), PR (31,0%), PL (3,2%), ostatní buňky tvořily jen 2,4%. Naše výsledky DHC neshodovaly ani s jedním pozorováním jiných autorů. Stettler et al. (1998) udává u 5. instaru přibližně stejné zastoupení GR, PL a SP – po jedné třetině a zbylé OEN a PR jen v malém množství. Pro lepší identifikaci hemocytů použili doplňující test navázání monoklonální protilátky na GR, který prokázaly shodu

s pozorováním ve fázovém kontrastu v 5 případech ze 6. Strbáčková (2000) v rozporu s ním u stejného instaru uvádí více PL (43%) a méně GR (20%) s použitím metody barvení podle Pappenheima. Gelbič et al. (2006) u 6. instaru zkoumal vývoj hemocytů během ontogeneze a u 6. instaru uvádí vývoj DHC po dnech. Výsledkem byly hodnoty procentuálního počtu hemocytů v rozmezí: PL (60-80%), GR (5-25%), SF (8-16%), OEN (1,5-2,6%), PR uvedeny nebyly. Gelbič et al. (2006) prokazuje též přirozenou fluktuaci DHC, která může být důsledkem vývojových procesů organismu. Poslední prací, která byla nalezena je Brillard (2001), kde je počet GR a PL dohromady tvoří 90%, SF a PR po 5% a jen nepatrné množství tvoří OEN a tzv. velké granulocyty. Brillard (2001) použil opět jinou metodu – chování buněk v monovrstvě. V řádu Noctuidae se vyskytuje nejvíce variací v počtech OEN, PL a PR. (Da Silveira et al., 2003) a zastoupení hemocytů (u Lepidopter) se pohybuje v těchto rozmezích: GR (50-75 %), PL (14-30%), SPH (1-35 %) a OEN (1-2%) (Stettler et al., 1998). Mezi výsledky těchto autorů i našimi jsou tedy rozdíly, které mohou být opět vysvětleny použitím různých laboratorních metod, nejednotné klasifikace a přirozené variability mezi populacemi hmyzích druhů. Především poukazují na nestandardnost těchto metod a na přetrvávající nejednotnost mezi kritérii klasifikace hemocytů.

Naše metoda pozorování fagocytů ve světelném mikroskopu po obarvení panoptickým barvením přinesla dobrý základ rozlišení typů hemocytů, které ale nebylo zcela jednoznačné, a proto navrhuje doplnění o další identifikační testy, které by rozlišily zvláště PL, GR a PR mezi sebou.

6.2 Stanovení změn hemotoxicity pomocí fagocytárních testů

6.2.1 Vyšetření změny DHC

V naší studii nabyly zaznamenány signifikantní změny DHC vlivem Tebufenozidu, ale přesto bylo patrné snížení PR, především malých PR, zvýšení GR, hlavně velkých GR, a mírné snížení počtu PL.

Změny DHC a THC (total hemocyte count= celkový počet hemocytů) jsou běžné při ontogenezi (Gelbič et al., 2006), při infekci nebo stimulaci rozličnými částicemi (Borges, 2007), stresu (Russo et al., 2006), působení toxikálií (Friche a Tripp,

1980) atd. Probíhá pod hormonální kontrolou. (Beetz et al., 2008) Hormony mají určitý vliv na stimulaci přisedlých HC vedoucí k jejich uvolnění do oběhu, tím se zvyšuje celkový počet cirkulujících hemocytů (Pathak, 1991). Některé vědecké hypotézy vysvětlují změny diferenciálního rozpočtu teorií prekurzorových buněk, za které jsou u Lepidopter nejčastěji považovány PR, nebo PR a PL společně. Při rozpadu nebo sníženém počtu efektorových hemocytů dochází k jejich náhradě novými nediferencovanými buňkami (Wittig, 1973), které mohou někdy také převzít jejich úlohu. Anebo jako v našem případě zvýšení počtu efektorových buněk a snížení méně diferencovaných buněk může být známkou zvýšené diferenciace v důsledku stimulace obranných mechanismů jako popisuje např. Borges (2006). Jedním z možných důvodů pozorovaných změn DHC mohou být rozpad nestabilních buněk, anebo záměny buněk způsobené morfologickými změnami. Jsou také prokázány aktivace obranných mechanismů a změny v DHC vstříknutím umělých částic *in vivo* a *in vitro* (Borges, 2006, 2007 aj.), které námi studovány nebyly.

Studie účinků Tebufenozidu na DHC bezobratlých nebyly v literatuře nalezeny. Pouze je zaznamenáno zvyšování celkového počtu hemocytů u *S. littoralis* (Mourad et al., 2004), které je způsobeno předčasným vývojem, růstem a zvyšováním objemu hemolymfy. DHC může být ovlivněno aplikací toxické látky, jak je to uvedeno v mnoha studiích, ale není považován za spolehlivý indikátor.

6.2.1 Vyšetření změn fagocytózy

Námi použité testy pozorování fagocytózy ve světelném mikroskopu a test produkce ROI redukcí NBT solí signifikantně odrážely změny fagocytózy, které jsme předpokládali. Odborná literatura dokumentuje zvýšení fagocytózy vlivem ekdyteroidních hormonů v práci Figueiredo et al. (2006). Další studie vlivu ekdyteroidů na hemocyty nebyly nalezeny, ale změny fagocytární aktivity jsou častým jevem u různých toxických látek, i když často jen v některých z parametrů, jako např. produkce ROI. (Russo a Lagadic, 2000) Z tohoto hlediska jsme byli rádi, že se změny fagocytární aktivity mohly projevit ve všech zkoumaných testech, a mohli jsme tak hodnotit výsledky těchto metod.

Již změny v DHC naznačovaly určitý vývoj ve změnách počtů hemocytů, ale nebyly statisticky signifikantní. Některé studie ani nepovažují změny v počtech imunitních buněk za spolehlivý indikátor změn imunitní schopnosti..

Změny ve fagocytární schopnosti se projevily zvýšením FA, FI i produkce ROI po podání Tebufenozidu. Jeden typ buněk, který většinou není uváděn v ostatních pracích jako schopný fagocytózy, byl pozorován jako fagocytárně aktivní. V ostatní literatuře se jedná o velmi málo zastoupení typ hemocytů a z toho důvodu není většinou blíže hodnocen s ohledem na fagocytární aktivitu, anebo je hodnocen jako nefagocytující. (Ribeiro a Brehelin, 2006; Costa et al., 2005) Náš vysoký počet PR je možné vysvětlit tím, že se jednalo o ne zcela vyzrálé formy PL a GR, které měly schopnost fagocytózy, ale chyběly u nich rozpoznávací znaky diferencovaných stádií, a byly z toho důvodu zařazeny do špatné skupiny. Anebo PR opravdu fagocytovaly. Některé práce se totiž zmiňují o tom, že jsou PR za určitých podmínek schopné fagocytózy. Ling et al. (2005) ukazuje na to, že alespoň některé PR jsou zajisté schopny fagocytózy, přičemž tímto způsobem tvoří záchranný mechanismus např. po infekci nebo ve stádiu vývoje, aby nahradily snížený počet jiných efektorových hemocytů. Tyto prohemocyty nebylo možné považovat za nevyzrálé formy granulocytů a později se některé z nich vyvinuly v PL, které v *Bombyx mori* nefagocytují (Nakahara et al., 2003; cit. Ling et al. 2005). Ling et al. (2005) se domnívá, že stres může být iniciátorem aktivace změn funkce PR a PL k fagocytóze. Naši metodu ovšem považujeme za relativně neinvazivní a také nebyla poskytnuta příležitost k dlouhodobějším změnám, který vyvolají stresovou reakci u hemocytů a aktivují u nich fagocytózu, a proto tuto možnost spíše vylučujeme. Protože výsledky pozorování fagocytózy MSHP částic v mikroskopu považujeme za relativně spolehlivé, zůstává tak především problém klasifikace hemocytů, který by vysvětloval špatně zařazené buňky do skupiny PR.

MSHP částice ve vzorcích obarvených Pappenheimovým barvením byly velmi dobře viditelné pro svou tmavě fialovou barvu, která je povětšinou jednotná, jen někdy o trochu světlejší, což je možné natrávením, ale jejich pravidelný tvar a velikost zaručují rozpoznání těchto částic. Problémem může být stanovení toho, které částice jsou teprve adherovány na povrchu hemocytu a které jsou už zfagocytovány. Hodnocení bylo

prováděno tak, že jako fagocytovaná byla hodnocena jen ta částice, která byla zcela uvnitř buňky. Přesto nevylučujeme, že některé částice buňky mohly být místo pouze adherovány seshora na povrchu buňky. Takové chování je možné u GR a OEN produkující lepkavé koagulum (Gregore a Goffinet, 1979) a kyselý mukopolysacharid (Anderson a Chain, 1979) a způsobující tak adherenci cizích částic na svém povrchu. Naše výsledky ale vyjadřují tak průkaznou fagocytární schopnost, takže nepovažujeme tento jev za nějak důležitý. Dalším úskalím této metody je velký počet zfagocytovaných MSHP částic, které se uvnitř malých buněk, které byly paradoxně hlavními fagocyty, překrývaly na malém prostoru a bylo často problémem přesně určit počet zfagocytovaných částic. Za druhé bylo horší hodnocení u těch GR, které měly tmavší cytoplazmu a MSHP částice v nich nebyly zcela zřetelné. Toto je problém možná tmavšího obarvení vzorku, které by se dalo kratší dobou barvení zlepšit. Ty buňky, které se však ve vzorku neadherují na podložní sklo, je téměř nemožné identifikovat a rozeznat, jaké částice obsahují, a proto nejsou možné hodnotit.

Vyzkoušeli jsme také různě dlouhé časy inkubace: 20, 40, 60 a 120 minut, abychom určili dobu, při které buňky nejvíce fagocytují a zároveň jsou dobře pozorovatelné, protože po delší době dochází k jejich rozpadu in vitro. Pro delší uchování hemocytárních kultur byly testovány také tři fyziologické roztoky: PBS, Ringerův roztok a směs fenylthiomocoviny rozpuštěná s Ringerovým roztokem. Ani jeden nebyl schopen zcela zamezit hemolýze některých buněk, ale jako nejvhodnější z nich byl vybrán Ringerův fyziologický roztok pro hmyz.

Výsledkem mikroskopického pozorování byly parametry fagocytární aktivity a fagocytárního indexu. Jako hlavní fagocyty *S. littoralis* jsme pozorovali GR a PR, a PL a neklasifikované typy buněk fagocytovaly v menší míře. FA granulocytů a prohemocytů byla asi 50%, plazmatocytů 19% a neklasifikovaných hemocytů 18%. Fagocytární aktivitu vykazovaly o trochu více větší PR než malé PR a 1,5 krát více malé GR než velké GR. Fagocytární index byl vyšší u velkých buněk než u malých buněk, domníváme se že proporcionálně k jejich velikosti. Také FI prohemocytů bylo asi 1,5krát vyšší než granulocytů v průměru. To podle našeho názoru odpovídá právě

průměrné velikosti buněk, protože PR se vyskytovaly hojně i ve střední velikosti narozdíl od GR, které byly převážně malé.

Plazmatocyty a neklasifikované buňky měly v průměru nižší FI než PR a GR. A bereme-li v potaz také jejich nízkou míru aktivace při fagocytóze, je otázkou, jakou úlohu hrají při fagocytóze a zda se jedná skutečně o fagocytující buňky. Hlavní funkcí PI je totiž enkapsulace, a proto občasná fagocytóza jednoho či dvou MSHP částic mohla být jedn prvním krokem enkapsulace. Ribeiro a Brehelin (2006) se domnívají, že rozdíly v pozorování PL ve fagocytární aktivitě, pramení výhradně z rozdílných podmínek experimentu a závisí na velikosti a typu částic. Co se týče neklasifikované skupiny hemocytů, byly objeveno podobné chování při fagocytóze, které se velmi lišilo od GR, a tím připomínají spíše plazmatocyty, ke kterým pravděpodobně patří.

Test produkce ROI byl proveden metodou na mikrodestičce podle Pick et al. (1943), která je jednoduchá a rychlá. Výsledkem bylo potvrzení předchozích výsledků, totiž signifikantní zvýšení NBT redukce po podání Tebufenozidu s vyšší dávkou. Výsledná hodnota měřená spektrofotometrem byla zmenšena o hodnotu negativních kontrol. Mezi pohlavími nebyly naměřeny signifikantní rozdíly, přesto samice vykazovaly vždy nižší hodnoty než samci ve stejné skupině.

Navíc byl proveden test s těmito změnami: inkubace byla prodloužena na 24 hodin, kdy larvy jevíly známky toxického působení Tebufenozidu, a testovaná dávka Teb 17,2 byla 10krát vyšší. Tato vyšší dávka způsobila při osmi hodinové inkubaci signifikantní pokles pod kontroly, ale po 24 hodinách se opět zvýšil. Změny u kontrolních larev byly prozkoumány také a zjistili jsme, že produkce ROI byla naopak po 24 hodinách nižší než po 8 hodinách. Vysvětlením snížení hodnoty NBT u vyšší dávky může být převaha toxického působení dávky, které se po čase zase upravily. Vyšší NBT hodnoty kontrolních zvířat od slepých pokusů ukazují na stimulaci aktivity ROS systému přidáním MSHP partikulí do hemolymfy in vitro a tím potvrzují produkci reaktivních kyslíkatých intermediátů hemocyty *S. littoralis* jako např. ve studiích (Kabbur et al., 1991; Ratcliffe, 1984; Gotz, 1986; Takahashi, 1995). Odborná literatura podporuje naše výsledky.

Mezi pohlavími byly zaznamenány signifikantní rozdíly v FI. Samice měly FI vždycky nižší než samci. Všechny typy prohemocytů a granulocytů jevíly tyto odchylky, u malých a velkých GR statisticky významné. Naopak u plazmatocytů a neklasifikovaných buněk byl FI vyšší u samic. Podle Ling a Yu (2006) mají většinou samice lepší imunitní systém – více hemocytů a vyšší schopnost fagocytárně aktivních buněk, zatímco FI bývá stejný. Ve studiu *S. littoralis* jsme došli k jinému závěru, ale celkový počet hemocytů nebyl zjišťován.

Fagocytózu mohou ovlivnit také stres, pohlaví, vývoj, reprodukce, individuální rozdíly, přítomnost parazitů a jiných infekcí (Kurtz, 2002; Russo a Lagadic, 2000), roční období (Anderson, 1993), cirkadiánní rytmus (Berger a Slapničková, 2003). Charakter laboratorních testů kterými jsou typ a velikost fagocytovaných částic, počet cirkulujících hemocytů a míra frekvence styku s cizorodými částicemi (Russo et al., 2006), zvýšená teplota (Feng Feng, 1974), změny salinity (Fischer a Newell, 1986) a další. Významným modulačním faktorem, který nelze zcela ovlivnit je např. stres. Podobné studie *S.littoralis* jako naše, zkoumaly vliv stresu srovnáním výsledků neaplikovaných zvířat a slepých pokusů, ale nezaznamenaly mezi nimi žádné rozdíly. (Gelbič et al, 2006; Berger, 1987; Berger et al., 2003).

7. Závěr

- I. Metoda pozorování fagocytózy ve světelném mikroskopu a barvení Pappenheimovým barvením přinesla dobrý základ rozlišení typů hemocytů. Navrhujeme její doplnění o nějaký další identifikační test PL a GR, který by jednoznačně diferencoval různé typy hemocytů.
- II. Provedením našich testů bylo prokázáno předpokládané zvýšení fagocytární schopnosti na modelovém objektu, které mohlo rozlišovat mezi jednotlivými typy hemocytů, mezi jedinci, pohlavími a odráželo statisticky významné modulace při změnách testovacích podmínek.
- III. Také hemocyty *S. littoralis* můžeme hodnotit jako vhodný modelový objekt pro screening hemotoxicity, s jediným nedostatkem, kterým je potřeba sjednocení klasifikace hemocytů.

8. Literatura

- Adema, C.M., Van Deutekom-Mulder, E.C., Van Der Knaap et al. (1991): Generation of oxygen radicals in hemocytes of the snail *Lymnaea stagnalis* in relation to the rate of phagocytosis. *Developmental and Comparative Immunology*, 15(1-2): 17-26.
- Adema, C.M., Van Deutekom-Mulder, E.C., Van der Knaap, W.P.W., Sminia, T. (1993): NADPH-oxidase activity: The probable source of reactive oxygen intermediate generation in hemocytes of the gastropod *Lymnaea stagnalis*. *Journal of Leukocyte Biology*, 54(5): 379-383.
- Akai, H, Sato, S (1973): An ultrastructural study of the haemopoietic organs of the silkworm, *Bombyx mori*. *J Insect Physiol*, 17:1665– 1676.
- Akai, H., Sato., S. (1976): Surface ultrastructure of the larval hemocytes of the silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera : Bombycidae). *Int. Insect Morphol. Embryol.*, 5: 17-21.
- Alfonso, T.B., Jones, B.W. (2002): g cm² promotes glial cell differentiation and is required with glial cells missing for macrophage development in *Drosophila*. *Dev Biol.*, 248: 369–383.
- Anderson, R.S., Oliver, L.M., Jacobs, D. (1992): Immunotoxicity of cadmium for the eastern oyster *Crassostrea Virginica*. *J. Shellfish Res.*, 11: 31-35.
- Anderson, RS (1993): Modulation of non-specific immunity by environmental stressors. *Advances in fishenes science. pathobiology of marine and estuarine organisms*. CRC Press, Boca Raton, s. 483-510.
- Anderson, R.S. (1994): Haemocyte derived reactive oxygen intermediate production in four bivalve molluscs. *Dev. Comp. Immunol*, 18: 89-96.
- Arnold, J.W. (1982): Larval heocytes in Noctuidae (Insecta: Lepidoptera). *Int. J. Insect Morph. Embryol.*, 11: 173-188.
- Bactor, I.Z.(1981): Studies on lipids in the hemolymph of the cottno leaf worm *Spodoptera littoralis*, late final instar larvae, infected with nuclear polyhedrosis virus. *J. Invert. Pathol.*, 38: 434-436.
- Bang, F. B. (1975): Phagocytosis in invertebrates. *Invertebrate immunity*. Academic Press, New York, s. 137-151.
- Beaulaton, J. (1979): Hemocytes and hemocytopenesis in silkworms. *Biochemie*, 61: 157–164
- Beetz, S, Holthusen, TK, Koolman, J, Trenczek, T (2008): Correlation of hemocyte counts with different developmental parameters during the last larval instar of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Arch Insect Biochem Physiol.*, 67(2): 63-75.
- Berger, J. (1987): Haematological preclinical recording of adverse drug reacdtions – current status, problems and needs. Part I: Standardization of experiments in relation to heamatological examinations. *Folia Haematol.*, 114: 1-15.
- Berger J. (1988): HEMA-particles phagocytosis of rat neutrophils. *Folia Haematol Int Mag Klin Morphol Blutforsch.*, 115(6): 833-6.

- Berger, J., Slapničková, M. (2003): Circadian structure of rat neutrophil phagocytosis. *Comp Clin Path*, 12: 84–89.
- Berger, J., Walczysko, J., Pávková, J., Gutzeit, HO (2003): Effects of genistein on insect haemocytes. *J. Appl. Biomed.*, 1: 161-168.
- Bergin, D., Reeves, E.P., Renwick, J. et al. (2005): Superoxide Production in *Galleria mellonella* Hemocytes: Identification of Proteins Homologous to the NADPH Oxidase Complex of Human Neutrophils. *Infect Immun.*, 73(7): 4161-4170.
- Bílej, M., Větvíčka, V. et al. (1990): Phagocytosis of synthetic particles in earthworms. Effect of antigenic stimulation and opsonization. *Folia Biol (Praha)*, 36(6): 273-80.
- Bjerknes, R. (1984): Flow cytometric assay for combined measurement of phagocytosis and intracellular killing of *Candida albicans*. *J. Immunol Methods.*, 72 (1): 229-241.
- Boman, H.G., Hultmark, D. (1981): Cell-free immunity in insects. *Trends Bioche. Sci.*, 6: 306-309.
- Bogdan, C., Rollinghoff, M., Diefenbach, A. (2000): Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr. Opin. Immunol.*, 12: 64–76.
- Borges, A.R., Santos, P.N., Furtado, A.F., Figueiredo, R.C.B.Q. (2007): Phagocytosis of latex beads and bacteria by hemocytes of the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *Micron.*, 39(4): 486-94.
- Brehélin, M., Hoffmann, J.A. (1980): Phagocytosis of inert particles in *Locusta migratoria* and *Galleria mellonella* study of ultrastructure and clearance. *Journal of Insect Physiology*, 26: 103-111.
- Brehélin, M.; Zachary, D. (1986): 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.
- Brillard, J., Ribeiro, C., Boemare, N. et al. (2001): Two Distinct Hemolytic Activities in *Xenorhabdus nematophila* Are Active against Immunocompetent Insect Cells. *Appl Environ Microbiol.*, 67(6): 2515-2525.
- Brousseau, P., Payette, Y., Blakley, B.R. et al. (1999): *Manual of Immunological Methods*, CRC Press, Boston, USA, 141 s.
- Bulet, P., Hetru, C., Dimarcq, J.L., Hoffmann, D. (1999): Antimicrobial peptides in insects: structure and function. *Dev. Comp. Immunol.*, 23: 329–344.
- Burešová (2002): *Fagocytóza hemocytů Pyrrhocoris apterus*. Bakalářská práce. Vedoucí práce Doc. Berger. Biolog. Fak. JU.
- Burger, J., Fossi, C., McClellan-Green, P., Orlando, E.F. (2007): Methodologies, bioindicators, and biomarkers for assessing gender-related differences in wildlife exposed to environmental chemicals. *Environmental Research*, 104 (1): 135-152.
- Coles, J.A., Farley, S.R., Pipe, R.K. (1995): Alteration of the immune response of the common marine mussel, *Mytilus edulis*. *Dis. Aquat. Org.*, 22: 59–65.

- Costa, S.C.P., Ribeiro, C., Girard, P.-A. et al. (2005) Modes of phagocytosis of Gram-positive and Gram-negative bacteria by *Spodoptera littoralis* granular haemocytes. *J. Insect Physiol.* 51: 39–46.
- Cotter, S.C., Wilson, K. (2002): Heritability of immune function in the caterpillar *Spodoptera littoralis*. *Heredity*, 88(4): 229-34.
- Da Silveira, EB, Ribeiro, BM, Bao, SN (2003): Characterization of larval haemocytes from the velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *J Submicrosc Cytol Pathol.*, 35(2):129-39.
- Davenport, A.P., Wright, D.J. (1985): Physiological saline for the larvae of *Spodoptera littoralis* based on analysis of the hemolymph. *J. Econ. Entomol.*, 78: 1151-1153.
- Descotes, J., Vial, T. (1994): Immunotoxic effects of xenobiotics in humans: A Review of current evidence. *Toxicol. in vitro*, 8: 963-966.
- Descotes, J. (2006): Methods of evaluating immunotoxicity. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, 2(2): 249-259.
- Dikkeboom, R., van der Knaap, W.P.W. et al. (1988): The production of toxic oxygen metabolites by hemocytes of different snail species. *Dev. Comp. Immunol.*, 12: 509–520.
- Drif, L., Brehelin, M. (1993): Structure, Classification and Functions of Insect Haemocytes. *Insect Immunity*. Oxford and IBH Pub. Co, New Delhi., s. 1-14.
- Duvic, B., Hoffmann, J.A., Meister, M., Royet, J. (2002): Notch signaling controls lineage specification during *Drosophila* larval hematopoiesis. *Current Biology*, 12:1923–1927.
- Dyrynda, E.A., Pipe, R.K., Burt, G.R., Ratcliffe, N.A. (1998): Modulations in the immune defences of mussels (*Mytilus edulis*) from contaminated sites in the UK. *Aquat. Toxicol.*, 42: 169–185.
- Essawy, M., Maleville, A., Brehelin M. (1985): The hemocytes of *Heliothis armigera*: ultrastructure, functions, and evolution in the course of larval development. *J. Morphol.*, 186: 255-264.
- Fadock, V.A., Chimini, G. (2001): The phagocytosis of apoptotic cells. *Semin. Immunol.*, 13: 365–372.
- Fenner-Crisp, P.A. (2000): Endocrine modulators: Risk characterization and assessment. *Toxicologic Pathology*, 28 (3): 438-440.
- Fernandes, M.D., Queiroz, M.L.S. (1999): Measurement of the respiratory burst and chemotaxis in polymorphonuclear leukocytes from anti-ChE insecticides-exposed workers. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 21 (3): 621-633.
- Fisher, W.S., Newell, R.I.E. (1986): Salinity effects on the activity of granular hemocytes of American oysters, *Crassostrea virginica*. *Biol. Bull.*, 170:122-134.
- Figueiredo MB, Castro DP, S Nogueira NF et al. (2006): Cellular immune response in *Rhodnius prolixus*: role of ecdysone in hemocyte phagocytosis. *J. Insect Physiol.*, 52(7): 711-6.
- Fournier, M., Cyr, D., Blakle, B. et al. (2000): Phagocytosis as a Biomarker of Immunotoxicity in Wildlife Species Exposed to Environmental Xenobiotics. *American Zoologist*, 40(3):412-420.

- Fournier, M., Pellerin, J., Lebeuf, M., et al. (2002): Effects of exposure of *Mya arenaria* and *Mactromeris polynyma* to contaminated marine sediments on phagocytic activity of hemocytes. *Aquat. Toxicol.*, 59: 83–92.
- Galloway TS, Depledge, MH (2001): Immunotoxicity in invertebrates: measurement and ecotoxicological relevance. *Ecotoxicology*, 10: 5–23.
- Gelbič, I., Strbáčková, Berger, J. (2006). Influence of Metyrapone on the Morphology of Hemocytes of the Egyptian Cotton Leafworm *Spodoptera littoralis* (Boisd.). *Zool. Studies*, 45(3): 371-377.
- Germolec et al. (2004): The accuracy of extended histopathology to detect immunotoxic chemicals. *Toxicological Sciences*, 82 (2): 504-514.
- Gillespie, J.P., Kanost, M.R., Trenczek, T. (1997): Biological mediators of insect immunity. *Annu. Rev. Entomol.*, 42: 611–643.
- Glupov, V.V., Khvoshevskaya, M.F., Lozinskaya, Y.L. et al. (2001): Application of the nitroblue tetrazolium-reduction method for studies on the production of reactive oxygen species in insect haemocytes. *Journal of Insect Physiology*, 37 (6): 453-460.
- Götz, P., Boman, H.G. (1985): Insect immunity. *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 3: 453-485.
- Götz, P. (1986): Encapsulation in Arthropods. *Immunity in Invertebrates*. Springer, Berlin, s. 153–170.
- Gupta, A.P. (1979): Hemocyte types: their structure, synonymies, interrelationships, and taxonomic significance. *Insect hemocytes*. Cambridge University Press, Cambridge, s. 85-127.
- Gupta, A.P. (1991): *Immunology of Insects and Other Arthropods*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Haley, P.J. (2003): Species differences in the structure and function of the immune system. *Toxicology*, 188 (1): 49-71.
- Harford, AJ, O'Halloran, K, Wright, PFA (2005): The effects of in vitro pesticide exposures on the phagocytic function of four native Australian freshwater fish. *Aquat Toxicol.*, 75:330–342.
- Harpaz, I., Kislev, N., Zelcer, A. (1969): Electron-microscopic studies on haemocytes of the egyptian cottonworm, *Spodoptera littoralis* (Boisduval) infected with a nuclear-polyhedrosis virus, as compared to noninfected hemocytes. I Noninfected haemocytes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 14: 175–185.
- Hartenstein, V. (2006): Blood cells and blood cell development in the animal kingdom. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, 22:677-712.
- Hinton, D.M. (1992): Testing guidelines for evaluation of the immunotoxic potential of direct food additives. *Critical reviews in food science and nutrition*, 32 (2): 173-190.
- Hoffmann, J.A. (2003): The immune response of *Drosophila*. *Nature*, 426: 33–38.
- Holsapple, M.P., West, L.J., Landreth, K.S. (2003): Species comparison of anatomical and functional immune system development. *Birth Defects Research Part B - Developmental and Reproductive Toxicology*, 68 (4): 321-334.

- Huxham, I. M. and Lackie, A. M. (1988): Behaviour *in vitro* of separated fractions of haemocytes of the locust *Schistocerca gregaria*. *Cell Tiss.Res.*, 251: 677-684.
- Ilbäck NG, Friman G. (2007): Interactions among infections, nutrients and xenobiotics. *Crit Rev Food Sci Nutr.*, 47(5):499-519.
- Iwama R., Ashida M. (1986): Biosynthesis of prophenoloxidase in hemocytes of larval hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem.*, 16: 547-555.
- Jansen, W.T.M. et al. (2001): Comparison of a Classical Phagocytosis Assay and a Flow Cytometry Assay for Assessment of the Phagocytic Capacity of Sera from Adults Vaccinated with a Pneumococcal Conjugate Vaccine. *Clinical And Diagnostic Laboratory Immunology*, 8 (2): 245-250.
- Kabbur, MB, Jain, NC, Zinkl, JG, Farver, TB (1991): Heterogeneity in phagocytic and nitroblue tetrazolium reductive properties of neutrophils from cows. *Am J Vet Res.*, 52(12): 2023-8.
- Káčmár, P. (1990): Ecotoxicology of dominant chemical load on the environment and animal health. Doctoral dissertation thesis. Košice, 192 s.
- Káčmár P., Pistl, J., Mikula, I. (1999): Immunotoxicology and Veterinary Medicine. *Acta Vet. Brno*, 68: 57-79.
- Karp, R.D. (1996): Inducible humoral immune defense response i insect. *Invertebrate immunology*. Springer- Verlag Berlin Heidelberg, Germany, s. 67-87.
- Kohler, J. (2005): Effects that pesticides have on public water supplies (third place). *World Water Congress 2005: Impacts of Global Climate Change - Proceedings of the 2005*. World Water and Environmental Resources Congress, s. 8.
- Kunder, S.C. (2004): Overview on Immunotoxicology Testing- What it Predicts and What it Doesn't. *55th Annual Meeting of the American College of Veterinary Pathologists (ACVP) & 39th Annual Meeting of the American Society of Clinical Pathology (ASVCP), ACVP and ASVCP*. Nakl.: American College of Veterinary Pathologists & American Society for Veterinary Clinical Pathology, Middleton WI, USA.
- Kurtz, J. (2002): Phagocytosis by invertebrate hemocytes: causes of individual variation in *Panorpa vulgaris* scorpion flies. *Microsc. Res. Tech.*, 57: 456-468.
- Lackie, A.M (1988): Haemocyte behaviour. *Adv. Insect Physiol.*, 21: 85-178.
- Lavine, M.D., Strand, M.D. (2001): Surface characteristics of foreign targets that elicit an encapsulation response by moth *Pseudaletia includens*. *J. Insect Physiol.*, 47: 965-974.
- Lavine, M.D., Strand, M.D. (2002): Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32: 1295-1309.
- Lebestky, T., Chang, T., Hartenstein, V., Banerjee, U. (2000): Specification of *Drosophila* hematopoietic lineage by conserved transcription factors. *Science*, 288: 146-149.

- Lemaitre, B., Reichhardt, J.-M., Hoffmann, J.-M. (1997): Drosophila host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of organisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 14614–14619.
- Ling, E., Shirai, K. et al. (2005): Hemocyte differentiation in the hematopoietic organs of the silkworm, *Bombyx mori*: prohemocytes have the function of phagocytosis. *Cell Tissue Res*, 320: 535–543.
- Ling and, E., Yu, X.Q. (2006): Hemocytes from the tobacco hornworm *Manduca sexta* have distinct functions in phagocytosis of foreign particles and self dead cells. *Developmental and Comparative Immunology*, 30: 301–309.
- Livingstone DR, Chipman JK, Lowe DM, et al. (2000): Developmental biomarkers to detect the effects of organic pollution on aquatic invertebrates: a recent molecular, genotoxic, cellular and immunological studies on the common mussel (*Mytilus edulis* L.) and other mytilids. *Int J Environ Pollut*, 13:56–91.
- Lowenberger, C. (2001): Innate immune response of *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 31: 219–229.
- Luster, MI, Portier, C, Pait, DG et al. (1992): Risk assessment in immunotoxicology. I. Sensitivity and predictability of immune tests. *Fundam Appl Toxicol* 1992; 18(2):200-210.
- Luster, M.I., Portier, C., Pait, D.G., Germolec, D.R. (1994): The use of animal tests in risk assessment for immunotoxicology. *Toxicology in Vitro*, 8 (5): 945-950.
- Mourad, A.K., Saad, A.S., Esawy, M.M., Hassan, S.M. (2004): Influence of the nonsteroidal ecdysone agonist, tebufenozide, on certain biological and physiological parameters of the cotton leaf-worm, *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Noctuidae: Lepidoptera) in Egypt. *Communications in agricultural and applied biological sciences* 69 (3): 119-139.
- Muta, T., Iwanaga, S. (1996): The role of hemolymph coagulation in innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.*, 8: 41–47.
- Nakahara Y, Kanamori Y, Kiuchi M, Kamimura M (2003): Effects of silkworm paralytic peptide on in vitro hematopoiesis and plasmatocyte spreading. *Arch Insect Biochem Physiol*, 52:163–174.
- Neuwirth, M. (1974): Granular haemocytes, the main phagocytic blood cells in *Calpodes ethlius*. *Canadian Journal of Zoology*, 52: 783-784.
- Pathak, J.P.N. (1991): Effect of endocrine extracts on the blood volume and population of haemocytes in *Halys dentata* (Pentatomidae, Heteroptera). *Entomon.*, 16:251-255.
- Pávková, J. (2003): *Hemocyty Disdercus cingulatus*. Magisterská práce. Vedoucí práce doc. J. Berger. Biologická fakulta JU.
- Peakall, DB. (1992): *Animal biomarkers as pollution indicators*. London: Chapman and Hall, 291 s.
- Pech, L.L., Strand, M.R. (1996): Granular cells are required for encapsulation of foreign targets by insect hemocytes. *Journal of Cell Science*, 109: 2053–2060.
- Pech, L., Strand, M.R. (2000): Plasmatocytes from the moth *Pseudoplusia includens* induce apoptosis of granular cells, *Journal of Insect Physiology*, 46(12): 1565-1573.

- Pick, E., Charon, J., Mizel, D. (1981): A rapid densitometric microassay for nitroblue tetrazolium reduction and application of the microassay to macrophages. *RES Journal of the Reticuloendothelial Society*, 30 (6): 581-593.
- Ratcliffe, N.A., Gagen, S.J. (1977): Studies on the in vivo cellular reactions of insects, an ultrastructural analysis of nodule formation in *Galleria mellonella*. *Tissue and Cell*, 9: 73-85.
- Ratcliffe, N.A., Rowley, A.F. (1979): Role of hemocytes in defense against biological agents. *Insect Hemocytes. Development, Forms, Functions, and Techniques*, Cambridge University Press, Cambridge, s. 331-414.
- Ratcliffe, N. A., Walters, J. B. (1983): Studies on the in uiuo cellular reactions of insects: clearance of pathogenic and non-pathogenic bacteria in *Galleria mellonella* larvae. *J. Insect Physiol*, 29: 407-415.
- Ratcliffe, N.A., Leonard, C. , Rowley, A.F. (1984): Prophenoloxidase activation nonself recognition and cell cooperation in insect immunity. *Science*, 226: 557–559.
- Ribeiro, C., Simoes, N., Brehélin, M. (1996): Insect immunity: the haemocytes of the armyworm *Mythimna unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae) and their role in defence reactions. In vivo and in vitro studies. *Journal of Insect Physiology*, 42: 815–822.
- Ribeiro, C., Brehélin, M. (2006): Insect haemocytes: What type of cell is that? *Journal of Insect Physiology*, 52(5): 417-429.
- Rohloff, L.-H., Wiesner, A., Götz, P. (1975). A fluorescence assay demonstrating stimulation of phagocytosis by haemolymph molecules of *Gallerta mellonella*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 26 (2): 225-233.
- Rook, GAW, Steele, J, Umar, S, Dockrell, HM (1985): A simple method for the solubilisation of reduced NBT, and its use as a colorimetric assay for activation of human macrophages by c-interferon. *J Immunol Meth.*, 82: 161–167.
- Rowley, A.F., Ratcliffe, N.A. (1981): Insects. *Invertebrate Blood Cells*, vol. 2. Academic Press, New York, s. 421–488.
- Russo, J, Lagadic, L (2000): Effects of parasitism and pesticide-exposure on characteristics and functions of hemocyte populations in the freshwater snail *Lymnaea palustris* (Gastropoda: Pulmonata). *Cell Biol Toxicol.*, 16:15–30.
- Russo, J, Lagadic, L (2004): Effects of environmental concentrations of atrazine on hemocyte density and phagocytic activity in the pond snail *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda, Pulmonata). *Environ Pollut.*, 127:303–311.
- Russo, J, Lefeuvre-Orfilla, L, Lagadic, L (2007): Hemocyte-specific responses to the peroxidizing herbicide fomesafen in the pond snail *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda, Pulmonata). *Environ Pollut.*, 146 (2): 420-427.
- Russo, J., Madec, L. (2007): Haemocyte apoptosis as a general cellular immune response of the snail, *Lymnaea stagnalis*, to a toxicant. *Cell and Tissue Research.*, 328(2):431-441.

- Sass, M., Kiss, A., Locke, M. (1994): Integument and hemocyte peptides. *J. Insect Physiol.*, 40: 407–421.
- Selgrade, M.K (1999): Use of immunotoxicity data in health risk assessments: uncertainties and research to improve the process. *Toxicology*, 133: 59-72.
- Selgrade, M.K. (2007): Immunotoxicity - The risk is real. *Toxicological Science*, 100 (2): 328-332.
- Schmit, A.R., Ratcliffe, N.A. (1977). The encapsulation of foreign tissue implants in *Galleria mellonella* larvae. *J. Insect Physiol.*, 23: 175–184.
- Schulte, A., Ruehl-Fehlert, C. (2006): Regulatory aspects of immunotoxicology. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 57 (5-6): 385-389.
- Silverstein, S.C. (1995): Phagocytosis of microbes: insights and prospects. *Trends Cell Biol.*, 5: 141–142.
- Slapničková, M., Berger, J. (2002): Rat neutrophil phagocytosis following feed restriction. *Comparative Clinical Pathology*, 11(3): 172-177.
- Stettler, P., Trenczek, T., Wyler, T. et al. (1998): Overview of parasitism associated effects on host haemocytes in larval parasitoids and comparison with effects on their egg-larval parasitoid *Chelonus inanitus* on its host *Spodoptera littoralis*. *J. Insect Physiol.*, 44, 817–831.
- Strbáčková, J., (2000): *Morfologie hemocytů během vývoje druhu Spodoptera littoralis*. Bc. Práce. Vedoucí práce Doc. Berger. Biolog. Fak. JU.
- Strand, M.R., Noda, T. (1991): Alterations in the hemocytes of *Pseudoplusia includens* after parasitism by *Microplitis demolitor*. *Journal of Insect Physiology*, 37:839–850.
- Strand, M.R., Pech, L.L. (1995): Immunological basis for compatibility in parasitoid–host relationships. *Ann. Rev. Entomol.*, 40: 31–56.
- Strand, M.R., Beck, M.H., Lavine, M.D. (2006): *Microplitis demolitor* bracovirus inhibits phagocytosis by hemocytes from *Pseudoplusia includens*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 61:134–145.
- Strand M.R. (2008): The insect cellular immune response. *Insect Science*, 15: 1-14.
- Sweet, L.I., Zelikoff, J.T. (2001): Toxicology and immunotoxicology of mercury: A comparative review in fish and humans. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews*, 4 (2): 161-205.
- Šíma, P., Větvička, V. (1993): Evolution of immune reactions. *Crit. Rev. Immunol.* 13: 83-114.
- Tojo, S., Naganuma, F., Arakawa, S. and S. Yokoo (2000): Involvement of both granular cells and plasmatocytes in phagocytic reactions in the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *J. Insect Physiol.* 46:1129-1135.
- Vass, E., Nappi, A.J. (2001): Fruit fly immunity. *BioEssays*, 51: 529–535.
- Vos, J.G., Dybing, E., Greim, H.A. et al. (2000): Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. *Critical Reviews in Toxicology*, 30 (1): 71-133.

- Weeks, BA, Anderson, DP, DuFour, AP et al. (1992): Immunological biomarkers to assess environmental stress. *Biomarkers. Biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress*. Boca Raton: Lewis Publishers; s. 211-234.
- Weeks, BA, Hugget, RJ, Warinner JE et al. (1990): Macrophage responses of estuarine fish as bioindicators of toxic contamination. *Biomarkers of environmental contamination*. Boca Raton: Lewis Publishers; s. 193-201.
- Weiske, J., Wiesner, A. (1998): Detection of NO synthase-like NADPH diaphorase activity in an immunocompetent insect cell line. *Techniques in Insect Immunology SOS*. Fair Haven, s. 235-242.
- Weiske, J., Wiesner, A. (1999): Stimulation of NO Synthase Activity in the Immune-Competent Lepidopteran *Estigmene acraea* Hemocyte Line. *Nitric Oxide*, 3: 123-131.
- Whitten, M.M.A., Ratcliffe, N.A. (1999): In vitro superoxide activity in the haemolymph of the West Indian leaf cockroach, *Blaberus discoidalis*. *J. Insect Physiol.*, 45: 667-675.
- Wiesner, A. (1992): Characteristics of inert beads provoking humoral immune responses in *Galleria mellonella*. *J. Insect Physiol.*, 38: 533-541.
- Wiesner, A., Götz, P. (1993): Silica beads induce cellular and humoral immune responses in *Galleria mellonella* larvae and in isolated plasmatocytes, obtained by a newly adapted nylon wool separation method. *J. Insect Physiol.*, 39: 865-876.
- Wiesner, A., Wittwer, D., Götz, P. (1995): A Small Released *Galleria* Phagocytosis Stimulating Factor is by and Acts on Phagocytosing *mellonella* Haemocytes In Vitro. *J. insect Physiol.*, 42(9): 829-835.
- Wigglesworth, V.B. (1959): Insect blood cells. *Ann Rev Entomol.*, 4:1-16.
- Wigglesworth, V.B. (1974): The circulatory system and associated tissues. *Insect physiology*. Champaign and Hall London, s. 33-46.
- Wittig, G. (1973): Phagocytosis by blood cells in healthy and diseased caterpillars I. Phagocytosis of *Bacillus thuringiensis* Berliner in *Pseudaletia unipuncta* (Haworth). *Journal of Insect Physiology*, 19(4): 831-844.
- Yamashita, M., Iwabuchi, K. (2001): *Bombix mori* prohemocytes division and differentiation in individual microcultures. *J. Insect Physiol.*, 47: 325-331.
- Yokoo, S., Goetz, P., Tojo, S. (1995): Phagocytic activities of haemocytes separated by two simple methods from larvae of two lepidopteran species, *Agrotis segetum* and *Galleria mellonella*. *Appl. Entomol. Zool.*, 30: 343-350.
- Zbinden, L. C. (1987): A toxicologist's view of immunotoxicology. *Immunotoxicology*. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, s.1-11.

9. Klíčová slova

Fagocytóza

Hemocyty

Spodoptera littoralis (Boisd.)

Imunotoxikologie

Tebufenozide

Pappenheimovo barvení

NBT test

10. Seznam použitých zkratek

DHC	diferenciální rozpočet hemocytů (differential hemocyte count)
FA	fagocytární aktivita
FI	fagocytární index
GR	granulocyty
PL	plazmatocyty
mGR	malé granulocyty
mPR	malé prohemocyty
NBT	nitroblue tetrazolium
PR	prohemocyty
ROI	reaktivní kyslíkaté intermediáty (reactive oxygen intermediates)
ROS	reactive oxygen system
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
SF	sferulocyty
MSHP	mikrosférické hydrofilní partikule
THC	celkový počet hemocytů (total hemocyte count)
vGR	velké granulocyty
vPR	velké prohemocyty

11. Přílohy