

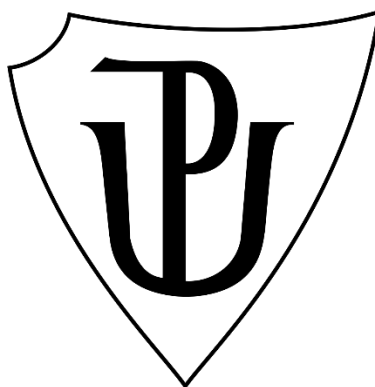
UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Hemocyty a ich charakterizácia v rámci bunkovej imunity
včiel

BAKALÁRSKA PRÁCA



Autor:	Karolína Filinová
Študijný program:	Biochémia
Forma štúdia:	prezenčná
Vedúci práce:	Mgr. Martina Janků, Ph.D.
Rok:	2023

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne s vyznačením všetkých použitých prameňov a spoluautorstiev. Súhlasím so zverejnením bakalárskej práce podľa zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, v znení neskorších predpisov. Bola som oboznámená s tým, že sa na moju prácu vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúce zo zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, v znení neskorších predpisov.

V Olomouci dňa

.....

Podpis študenta

Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko	Karolína Filinová
Názov práce	Hemocyty a ich charakterizácia v rámci bunkovej imunity včiel
Typ práce	Bakalárska
Pracovisko	Katedra biochémie
Vedúci práce	Mgr. Martina Janků, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2023

Abstrakt

Teoretická časť práce je zameraná na charakterizáciu hemocytov *A. mellifera*, vrátane možností ich štúdia. Hemocyty sú analógy ľudských bielych krviniek, u bezstavovcov, ktorých hlavnou telovou tekutinou je hemolymfa. Hemocyty sú hlavnými sprostredkovateľmi zložky vrodenej imunity hmyzu, známej ako bunková imunita. Ich pôsobenie zahŕňa riadené imunitné odpovede ako sú fagocytóza, nodulácia, enkapsulácia a melanizácia. Klasifikácia hemocytov je predmetom sporu, vzhľadom na to, že terminológia jednotlivých druhov hemocytov je rôzna u rôznych druhov hmyzu.

Cieľom experimentálnej časti práce bola najskôr optimalizácia metód izolácie a purifikácie hemocytov pre zavedenie rutinného protokolu. Ďalej to bola optimalizácia mikroskopického pozorovania hemocytov vo svetelnom poli, vrátane rôznych farbiacich techník hemocytov a stanovenie ich počtu v hemolymfe alebo v purifikovanej suspenzii hemocytov s využitím Bürkerovej komôrky. Rovnako bola pozornosť venovaná aj mikroskopickému stanoveniu životnosti hemocytov v nepurifikovanej hemolymfe v porovnaní s purifikovanou suspenziou hemocytov, s využitím farbiacej techniky Trypanovej modrej, a taktiež fluorescenčných sond, fluoresceíndiacetátu a propium jodidu. Purifikácia hemocytov z hemolymfy prebiehala pomocou centrifugácie na vrstve vysokohustotnej látky (Percollu). S využitím farbiva Trypanovej modrej bolo demonštrované, že túto metodiku ide použiť k zakoncentrovaniu hemocytov, ktoré si zachovávajú svoju životaschopnosť. Predložená bakalárska práca tak napomáha k optimalizácii izolácie hemocytov a ich

mikroskopickému pozorovaniu, pre ich ďalšie štúdium, vrátane ich lepšiemu porozumeniu v rámci bunkovej imunity včely medonosnej.

Kľúčové slová	Hemocyty, bunková imunita, <i>Apis mellifera</i> , životnosť buniek, mikroskopické pozorovanie
Počet strán	89
Počet príloh	0
Jazyk	Slovenský

Bibliographical identification

Author's first name and

surname Karolína Filinová

Title Hemocytes and their characterization in the cellular immunity of bees

Type of thesis Bachelor

Department Department of biochemistry

Supervisor Mrg. Martina Janků, Ph.D.

The year of presentation 2023

Abstract

The theoretical part of bachelor's thesis is focused on the characterisation of *A. mellifera* hemocytes, including their study options. Hemocytes are analogs of human leukocytes in invertebrates, which main body fluid is hemolymph. Hemocytes are main mediators of one aspect of innate immunity in insect, also known as cellular immunity. Their effect consists of mediated immune responses, which include phagocytosis, encapsulation and melanisation. The classification of hemocytes is matter of dispute, given that the terminology of individual types of hemocytes is different depending on the insect species.

The purpose of experimental part was firstly the optimisation of isolation and purification of hemocytes for establishment of routine protocol. Next goal was the optimisation of microscopic observation of hemocytes in bright field and determination of their quantity in hemolymph or in purified suspension of hemocytes with use of Burker cell. The attention was also paid to microscopic determination of hemocytic vitality in non-purified hemolymph compared with purified hemolymph, with the use of dye method Trypan Blue, as well as fluorescent probe, fluorescent diacetate and propium iodide. The purification of hemocytes from hemolymph was done with the use of centrifugation on layer of high density substance (Percoll). With the use of the dye Trypan Blue was demonstrated, that this method is suitable for increase in concentration of hemocytes, which are preserving their vitality.

The presented bachelor's thesis therefore helps to optimise the isolation of hemocytes and their microscopic obserbation, for their further study, including their better understanding within the cellular immunity of the honey bee.

Keywords Hemocytes, cellular immunity, *Apis mellifera*, cell vitality, microscopic observation

Number of pages 89

Number of appendices 0

Language Slovak

OBSAH

1 ÚVOD	1
2 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY	3
2.1 Základné poznatky o imunite hmyzu	3
2.1.1 Imunita včely medonosnej (<i>Apis mellifera</i>)	4
2.2 Obranné odpovede imunitného systému	7
2.2.1 Rozpoznanie patogénov	7
2.2.2 Aktivácia signálnych dráh imunitnej odpovede	7
2.2.2.1 Toll dráha	8
2.2.2.2 Imd dráha	9
2.2.2.3 JAK/STAT	10
2.2.3 Mechanizmy imunitných efektorových odpovedí	11
2.2.3.1 Fagocytóza	11
2.2.3.2 Melanizácia	12
2.2.3.3 Bunková enkapsulácia	13
2.2.3.4 Nodulácia	13
2.3 Hemocyty hmyzu	14
2.3.1 Hemocyty u včely medonosnej (<i>Apis mellifera</i>)	16
2.3.2 Hematopoéza	18
2.3.3 Migrácia hemocytov	19
2.4 Prehľad metód štúdia hemocytov	21
2.4.1 Všeobecná charakterizácia hemocytov	21
2.4.2 Metódy využité pre charakterizáciu hemocytov <i>A. mellifera</i>	22
3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	24
3.1 Materiál a prístroje	24
3.1.1 Chemikálie	24
3.1.2 Prístroje a experimentálne vybavenie	24
3.1.3 Biologický materiál	25
3.2 Použité metódy	25
3.2.1 Príprava biologického materiálu	25
3.2.1.1 Odber hemolymfy zo zmrazeného a živého materiálu	25
3.2.1.2 Purifikácia a zakoncentrovanie hemocytov	26
3.2.2 Mikroskopické pozorovanie nefarbených hemocytov	26
3.2.3 Mikroskopické pozorovanie farbených hemocytov	28
3.2.3.1 Giemsa farbenie	28
3.2.3.2 Neutrálna červeň	29
3.2.3.3 Farbenie jadier hemocytov pomocou DAPI	30
3.2.4 Stanovenie životnosti hemocytov	30
3.2.4.1 Stanovenie životnosti pomocou FDA	30
3.2.4.2 Stanovenie životnosti dvojitým farbením FDA/PI	31
3.2.4.3 Stanovenie životnosti pomocou Trypanovej modrej	32
4 VÝSLEDKY	33
4.1 Optimalizácia izolácie a purifikácie hemocytov	34
4.1.1 Odber hemolymfy pre purifikáciu hemocytov	34
4.1.2 Spracovanie hemolymfy pre purifikáciu hemocytov	37
4.1.3 Purifikácia a zakoncentrovanie hemocytov	39
4.1.3.1 Purifikácia hemocytov na vrstve Percollu	39
4.1.3.2 Purifikácia hemocytov klasickou centrifugáciou	43

4.2	Farbenie hemocytov pre mikroskopické pozorovanie	43
4.2.1	Giemsa farbenie	43
4.2.2	Neutrálna červeň	50
4.2.3	Farbenie jadier HC fluorescenčnou sondou DAPI	54
4.3	Stanovenie životnosti hemocytov	55
4.3.2	Stanovenie životnosti HC pomocou dvojitého farbenia FDA/PI	56
4.3.3	Stanovenie životnosti HC pomocou FDA	57
4.3.4	Stanovenie životnosti HC pomocou Trypanovej modrej	57
5	ZÁVER	63
6	LITERATÚRA	66
7	ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK	79

CIELE PRÁCE

V teoretickej časti bude vypracovaná literárna rešerš zhrnujúca

- základné poznatky o bunkovej imunite hmyzu so zameraním na včelu medonosnú;
- zhrnutie základnej charakteristiky, funkcie, a významu hemocytov pre hmyz;
- zhrnutie známych poznatkov o funkciách hemocytov u včiel;
- prehľad metód štúdia hemocytov.

Experimentálna časť bude zahŕňať

- zavedenie rutinného protokolu izolácie a purifikácie hemocytov včiel;
- zavedenie protokolu pre mikroskopické pozorovanie hemocytov vo svetelnom poli (vrátane rôznych farbiacich techník hemocytov a stanovenie ich počtu v hemolymfe/purifikovanej suspenzii hemocytov);
- mikroskopické stanovenie životnosti hemocytov s využitím farbiacich techník a fluorescenčných sond.

1 ÚVOD

Hemocyty sú bunky nachádzajúce sa u bezstavovcov, ktorých hlavnou telovou tekutinou je hemolymfa a sú to analógy ľudských bielych krviniek. Ich klasifikácia je predmetom sporu, vzhľadom na to, že terminológia jednotlivých typov hemocytov sa líši. Viaceré štúdie však potvrdzujú, že aj keď sú bunky rôzne pomenované, majú podobnú alebo dokonca až rovnakú funkciu u rôznych druhov hmyzu (Ribeiro & Brehélin, 2006).

Problematika hemocytov je v posledných rokoch pomerne častým predmetom skúmania, keďže hrajú významnú rolu v rámci bunkovej imunity hmyzu. Vzhľadom na celosvetové obavy ohľadom zachovania zdravia opeľovačov sa v posledných desaťročiach upriamila pozornosť konkrétne na hemocyty *Apis mellifera*, z dôvodu významu včiel v oblasti ekológie a rovnako aj poľnohospodárstva (Marringa et al., 2014).

Hemocyty hmyzu boli klasifikované podľa ich pohyblivosti a funkčných vlastností. Z hľadiska ich pohyblivosti, hemocyty buď cirkulujú v obehú hemolymfy tzv. cirkulujúce hemocyty alebo sú prichytené k tkanivám tzv. prisadlé hemocyty (Hillyer, 2016). Z ich funkčného hľadiska má väčšina druhov hmyzu viaceré subpopulácie, ktoré sa líšia morfológiou a funkciou, boli identifikované pomocou morfológických, histochemických a funkčných charakteristík. Medzi najčastejšie typy patria prohemocyty, granulocyty, plazmocyty, sferulocyty a oenocytoidy (Gábor et al., 2017).

Hemocyty sú primárne mediátory bunkami riadenej imunity (Marmaras & Lampropoulou, 2009) pretože eliminácia organizmov, ktoré preniknú do telovej dutiny hmyzu, hemocoelu, najprv vyžaduje aby boli hostiteľské bunky schopné atakujúce mikroorganizmy rozpoznať a poskytnúť na ne adekvátnu odpoveď na tieto patogény (Negri et al., 2015).

Po rozpoznaní cudzieho objektu, prvou odpoveďou hemocytov je tzv. „spreading“ alebo šírenie hemocytov (Negri et al., 2016). Táto vlastnosť hemocytov je často používaná pri určovaní miery funkčnosti imunitného systému (Dean et al., 2004). Veľkosť cudzieho objektu pri rozpoznaní hemocytmi so „spreading“ schopnosťou ovplyvňuje výber mechanizmu pre jeho zničenie (Negri et al., 2016).

Jedno z prvých pozorovaní hemocytov u *A. mellifera*, v roku 2010, pomocou farbiacej techniky Giemsa, odhalilo šesť typov hemocytov medzi ktoré patrili, prohemocyty, plazmatocyty, oenocytoidy, granulocyty, koagulocyty a binukleárne bunky, kde najpočetnejším typom boli plazmatocyty ďalej granulocyty a koagulocyty (El-Mohandes &

Fawazy, 2010). V súčasnosti sa využíva aj špecifickejších metód ich detekcie, napríklad využitím protilátok navrhnutým proti antigénom, ktoré sú špecifickou súčasťou jednotlivých typov hemocytov, čo prináša nové možnosti ich štúdia (Gábor et al., 2020).

2 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

2.1 Základné poznatky o imunite hmyzu

Mnohobunkové organizmy používajú na obranu voči patogénnym mikroorganizmom dva systémy známe ako vrodenná, nešpecifická, imunita a získaná, špecifická, imunita. Získaná imunita je založená na produkcii protilátok, ktoré rozpoznávajú špecifické antigény a tak napomáhajú organizmom v rozvíjaní ich imunologickej pamäte. Ešte donedávna bola známa informácia, že hmyz nemá získanú imunitu a má veľmi dobre vyvinutú len vrodennú imunitnú odpoveď (Lavine & Strand, 2002), avšak novšie výskumy poukazujú na to, že hmyz by mohol mať primitívnu formu získanej imunity (Lourenço et al., 2018; McMenamin et al., 2018).

Vrodenná imunita sa pri rozpoznávaní a následnom usmrcovaní cudzích organizmov spolieha na faktory zakódované v zárodočnej línii (Fearon, 1997). Základné obranné mechanizmy sa všeobecne rozdeľujú do troch základných vrstiev - fyzikálne bariéry pokožky a čreva, bunková imunita a humorálna imunita. Tieto zložky tvoria tzv. individuálnu imunitu, ktorú má každý samostatný jedinec.

Humorálna zložka imunity zahŕňa produkciu rozpustných efektorových molekúl ako sú antimikrobiálne peptidy (AmP) (Strand, 2008; Marmaras & Lampropoulou, 2009), reaktívne formy kyslíka alebo dusíka (Vass & Nappi, 2001) a komplex enzymatických kaskád regulujúcich koaguláciu a melanizáciu hemolymfy (Muta & Iwanaga, 1996; Gillespie and et al., 1997).

Pre porovnanie, bunková imunita zahŕňa hemocytmi riadené imunitné odpovede ako je fagocytóza, nodulácia, enkapsulácia a uzatváranie rán (Schmidt et al., 2001; Strand, 2008; Marmaras & Lampropoulou, 2009). Humorálna a bunková imunita sú navzájom veľmi previazané, keďže mnohé humorálne faktory ovplyvňujú funkcie hemocytov a hemocyty sú dôležitým zdrojom mnohých humorálnych molekúl (Lavine & Strand, 2002). Hmyz obsahuje rôzne mechanizmy pre boj s infekciou spôsobenou patogénnymi organizmami. Mnohé z nich sú chránené vrstvou antimikrobiálneho sekrétu na ich povrchu a prostredím žalúdka nepriaznivým pre patogény. Imunita hmyzu má veľa spoločných paralel s vrodennou imunitou ľudí a iných stavovcov, zahŕňajúce sekréciu AmP, fagocytózu a enzymatický rozklad patogénov. Hlavnou funkciou imunitného systému je systematická ochrana organizmu

pred vniknutím cudzích a patogénnych organizmov a ich deštrukcia po vniknutí do tela. Ako je už spomenuté vyššie, bunková imunita je zložená z imunitných odpovedí, ktoré sú sprostredkované bunkami a pre hmyz sú týmito bunkami hemocyty (Evans et al., 2006).

Hemocyty sú analógy ľudských leukocytov, bielych krviniek, rovnako ako u živočíchov. Existuje niekoľko druhov, ktoré sú delené na základe morfológických, histochemických znakov a funkcií. Medzi najčastejšie typy patrili prohemocyty, granulocyty, plazmatocyty, sferulocyty a oenocytoidy. Tieto typy boli popísané u viacerých rodov ako je *Lepidoptera*, *Diptera*, *Orthoptera*, *Blattaria*, *Cleoptera*, *Hymenoptera*, *Hemiptera* a *Collembola* (Lavine & Strand, 2002). U octomilky sú hemocyty pomenované inak ako u ostatného hmyzu. Napríklad v larválnom štádiu sú prítomné lamelocyty a kryštálové bunky. Rovnako ako plazmocyty, lamelocyty sú schopné priľnúť k cudzím povrchom. Naopak kryštálové bunky, u ostatného hmyzu nazývané oenocytoidy, sú nepriľnavé bunky, ktoré obsahujú prekurzory fenoloxidasy a sú prítomné v procese melanizácie (Lavine & Strand, 2002). Po vniknutí cudzích organizmov do tela hmyzu sú zaznamenané keď sa molekulárne vzory asociované s patogénmi (PAMP) pripoja k receptorom rozpoznávajúcim vzory (PRR). To následne aktivuje imunitné signálne dráhy, ktoré zosilnia imunitnú odpoveď, vyvolajú produkciu faktorov s antimikrobiálnou aktivitou a aktivujú efektorové dráhy. Medzi základné signálne dráhy zapojené do imunitných odpovedí hmyzu sa zaraďujú imunitné dráhy Toll, Imd a JAK/STAT. Aktivácia týchto a iných dráh vedie k aktivácii efektorových odpovedí vedúcich k zahubeniu patogénov pomocou procesov ako je fagocytóza, melanizácia, bunková enkapsulácia, nodulácia, lýza, RNA interferenciou (RNAi) sprostredkované zničenie vírusu, autofágia a apoptóza (Hillyer, 2016).

2.1.1 Imunita včely medonosnej (*Apis mellifera*)

Včela medonosná patrí do skupiny sociálneho hmyzu. Sociálny hmyz je často cieľom patogénov z dôvodu blízkeho kontaktu medzi jednotlivcami. Táto skupina organizmov je schopná využiť obranu voči patogénnym organizmom na úrovni skupiny a taktiež na úrovni jednotlivca. Pri porovnaní so samotárskym hmyzom môžu používať stratégie zabraňujúce rozšíreniu infekcie, taktiež je tam možnosť, že včely sa vzdávajú alebo potláčajú niektoré aspekty imunitnej obrany v dospelosti výmenou za iné schopnosti (Marringa et al., 2014). Napríklad v momente keď mladá včela krmíčka, ktorá vykonávala úlohy výhradne v úli

zaujme v dospelosti viac riskantnú rolu lietavky, priemerná dĺžka života rapídne klesá s čím je spojený úbytok funkčných hemocytov a výrazný nárast deformovaných alebo apoptických hemocytov - to znamená dramatický pokles imunity (Amdam et al., 2005; Münch et al., 2008). Štúdie včiel demonštrovali, že lietavky podstupujú dramatickú redukciu v množstve cirkulujúcich hemocytov, redukciu objemu hemolymfy a takmer úplne stratili schopnosť vytvárať noduly pri odpovedi na bakteriálne napadnutie (Bedick et al., 2001; Amdam et al., 2004). Šetrí sa tak energia (napr. zásoby jedla) potrebná pre zachovanie bunkovej imunity na bazálnej úrovni (Schmid et al., 2008). Okrem znižujúceho sa množstva hemocytov v priebehu starnutia včiel alebo počas premien medzi dočasnými štádiami vývinu (Wilson-Rich et al., 2008; Laughton et al., 2011) je redukovaný hlavne jeden typ bunkovej odpovede – enkapsulácia u starších včiel (Schmid et al., 2008; Jefferson et al., 2013).

Na úrovni skupiny je imunita nazývaná ako sociálna imunita a spolieha sa hlavne na behaviorálnu odpoveď na infekciu (Negri et al., 2016). Wilson-Rich et al., (2009) ich predstavili ako „antiseptické správanie“, ktoré zahŕňa aktivity ako tzv. grooming – alebo vyčesávanie, hygienické správanie, odstraňovanie mŕtvoliek nazývané aj ako nekroforické chovanie, vyhýbanie sa infikovaným obydliam, sekréciu žliaz napr. voskových a využívanie živice v úli. Hlavnou aktivitou je už zmienený grooming, čo znamená fyzické odstraňovanie parazitických roztočov z tiel dospelých včiel, vykonávajú ho robotnice (Negri et al., 2016). Taktiež je pre včely nesmierne dôležitá čistota v úli, ktorá rovnako napomáha znižovať účinok patogénnych baktérii, plesní a roztočov (Evans et al., 2006). Hygienické správanie, ktoré bolo u včiel popísané (Rothenbuhler & Thompson, 1956) je dnes typickým príkladom skupinovej ochrany a zahŕňa vyhľadávanie a odstraňovanie infikovaných lariev robotnicami (Spivak & Reuter, 2001), stavbu úľov z antimikrobiálnych materiálov (Christe et al., 2003), sociálnu horúčku ako odpoveď na ochorenie (Starks et al., 2000), prenášanie imunitných znakov na ostatné jedince v hniezde (Traniello et al., 2002; Sadd et al., 2005; Ugelvig & Cremer, 2007), vyhýbanie sa kontaminovaným obydliam (Rozen et al., 2008). Ďalej zahŕňa zber antimikrobiálnych látok (Simone-Finstrom & Spivak, 2010), vypúšťanie týchto látok na hniezdo a potomkov (Baracchi et al., 2012; Reavey et al., 2014), odstraňovanie mŕtvych alebo infikovaných jedincov (Diez et al., 2012), tzv. allogrooming (Walker & Hughes, 2009) - čo označuje starostlivosť o iné jedince v rámci jedného druhu väčšinou skrz čistenie srsti.

Generačný prenos imunitných znakov napr. vnútrovaječné toxíny, ktoré sú dodané rodičmi alebo endosymbiontmi prenesené transovariálne zo samice do vajíčok (Kellner, 2002). Vajíčka od rodičov, ktorí prekonali imunitnú hrozbu, vykazujú zvýšenú imunitnú aktivitu aj keď nečelia patogénnej infekcii či útoku parazitov. Rodičovský imunitný „priming“ pripravuje vajíčka na možné nebezpečenstvo tak, že spúšťa expresiu génov pre imunitu vo vajíčkach prípadne priamy prenos imunitných faktorov do vajíčok (Freitak et al., 2009). Efekt transgeneračného primingu na imunitu potomkov bol taktiež pozorovaný aj na neskorších štádiách vajíčok (larválne, štádium kukly a dospelom jedincovi (Moret & Schmid-Hempel, 2001; Rosengaus et al., 2013; Trauer-Kizilelma & Hilker, 2015).

Naopak imunita na úrovni jednotlivca u včely medonosnej zdieľa veľa so samotárskym hmyzom, ako je mechanická bariéra, kutikula, rovnako aj humorálne a bunkami zabezpečované imunitné odpovede. Dá sa povedať, že je prakticky rovnaká až na niektoré špecifiká pre konkrétny organizmus. Bunková imunita, zabezpečovaná hemocytmi, zahŕňa procesy ako fagocytóza mikroorganizmov, enkapsulácia väčších organizmov, zrážanie hemolymfy, nodulácia a melanizácia (Vilmos & Kurucz, 1998; Hoffmann et al., 1999; Honti et al., 2014; Dudzic et al., 2015). Včela medonosná a ostatný sociálny hmyz má menej génov spojených s imunitou príbuzných so samotárskym hmyzom, čo môže byť následok ich spoločných obranných mechanizmov (Barribeau et al., 2015; Doublet et al., 2017). Pri porovnaní včely medonosnej s ostatným hmyzom ako napríklad octomilka (*Drosophila melanogaster*) a komár (*Anopheles*), včela má len tretinu génov zameraných na imunitu, čo naznačuje ich vysokú imunologickú efektívnosť alebo ich náchylnosť k infekciám (Evans et al., 2006).

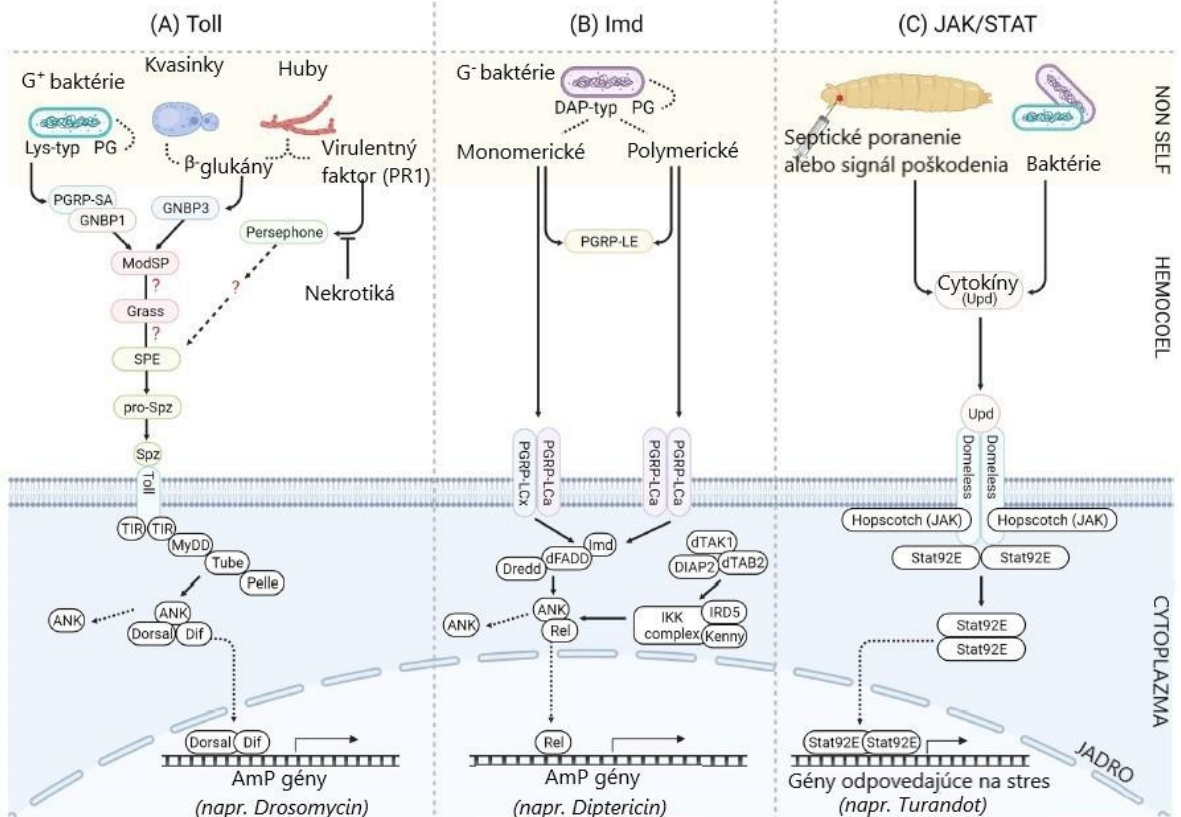
2.2 Obranné odpovede imunitného systému

2.2.1 Rozpoznanie patogénov

Iniciácia imunitnej odpovede vyžaduje rozpoznanie cudzieho organizmu. V priebehu infekcie, toto rozpoznanie prebieha keď sa PAMP, inak známe aj ako molekulárne vzory asociované s mikróbami (MAMP), pripoja k PRR. Tie rozpoznávajú motívy, ktoré sú prítomné v mikróboch a chýbajú u hmyzu. Sú koncepčne rozdelené do evolučne konzervovaných rodín. Patria tam proteíny rozpoznávajúce peptidoglykany (PGRP), proteíny imunoglobulínových domén, proteíny príbuzné fibrinogénu (FREP), proteíny obsahujúce thioesterovú skupinu, proteíny rozpoznávajúce β -1,3-glukán (tiež známe ako proteíny viažuce G^- baktérie), galektíny, lektíny typu C, proteíny s doménami bohatými na leucín (LRR), molekuly priľnavé k bunkám Downovho syndrómu (DSCAM) a Nimrod proteíny (Das et al., 2009; Palmer & Jiggins, 2015; Zhang et al., 2015; Hillyer, 2016). Niektoré z PRR proteínov pôsobia priamo pokým iné priamo vyvolávajú imunitné efektorové procesy ako je fagocytóza a melanizácia a iné aktivujú intracelulárne signálne dráhy, ktoré aktivujú transkripciu imunitných efektorových génov. Niektoré z nich aktivujú oboje zároveň (Levashina et al., 2001; Choe et al., 2002; Hillyer, 2016). Proteíny rodiny LRR nemusia priamo interagovať s PAMP, naopak regulujú imunitné odpovede prostredníctvom interakcie s inými hostiteľskými proteínmi (Fraiture et al., 2009; Hillyer, 2016). Príkladom PAMP sú bakteriálne peptidoglykany a β -1,3-glukány u húb (Hillyer, 2016).

2.2.2 Aktivácia signálnych dráh imunitnej odpovede

Rozpoznanie patogénnych organizmov indukuje aktiváciu signálnych transdukčných dráh, ktoré niekoľkonásobne zvyšujú imunitnú odpoveď, indukujú produkciu antimikrobiálnych faktorov a zvyšujú účinnosť efektorových mechanizmov (Hillyer, 2016). Signálne dráhy hmyzu sú študované hlavne na modelových organizmoch octomilke (*D. melanogaster*) a na komárovi *Anopheles gambiae* (Daníhlík, 2011). Gény pre signálne dráhy u včely medonosnej sú ortológne - u všetkých skúmaných organizmov vykonávajú rovnakú funkciu. Medzi potvrdené signálne dráhy včely medonosnej patrí Toll dráha, Imd dráha, JAK/STAT dráha a JNK signálna dráha (Obr. 1) (Evans et al., 2006).



Obrázok 1: Dráhy aktivácie a regulácie vrodenej imunity hmyzu. Tri signálne imunitné dráhy (A) Toll, (B) Imd a (C) JAK/STAT u *D. melanogaster* a imunitné odpovede aktivované na prítomnosť bakteriálnych a hubových organizmov. (A) Toll receptor je aktivovaný po naviazaní na ligand Spaetzle (Spz), ktorý je predtým aktivovaný tzv. Spaetzle-processing enzýmom (SPE). Dráha je aktivovaná ako odpoveď na G⁺ baktérie, β -glukány obsiahnuté v bunkovej sten kvasiniek a na virulentný faktor húb. Po tejto aktivácii sa odohráva signálna kaskáda procesov, do ktorej sa zapája rad proteínov. Výsledkom tejto kaskády je uvoľnenie transkripčných faktorov Dorsal a Dif z represie, ich translokácia do jadra a následná aktivácia transkripcie génov kódujúcich AmP. (B) Dráha imunitnej nedostatočnosti (Imd) je aktivovaná G⁻ baktériami cez receptory, PGRP-LC a PGRP-LE. Táto signálna dráha aktivuje cez rad procesov, mimo iné zapojuje proteín Imd, transkripčný faktor Relish (Rel), ktorého translokáciou do jadra je zahájená transkripcia génov kódujúcich AmP.

(C) Aktivátory JAK/STAT signálnej dráhy sú indukované septickým poranením/signálmi poškodenia alebo bakteriálnou infekciou cez väzbu cytokínov Unpaired (Upd) na cytokínový receptor Domeless (Dome). Aktivácia tejto signálnej dráhy vedie cez niekoľko procesov k dimerizácii transkripčného faktora STAT92, jeho translokácii do jadra kde aktivuje expresiu génov odpovedajúcich na stres. Prevzaté od (Zhang *et al.*, 2021).

2.2.2.1 Toll dráha

Toll signálna dráha je evolučne konzervovaná dráha, ktorá u hmyzu funguje vo vývine a aj ako súčasť imunity (Evans *et al.*, 2006; Hillyer, 2016). Receptory Toll a receptory podobné Toll (tzv. TLR) u hmyzu sú transmembránové signálne proteíny. Ako súčasť imunity

u octomilky, je iniciovaná keď sú PRR aktivované extracelulárnym cytokínom, Spätzle, ktorý sa naviaže na bunkový receptor Toll, čo vedie k intracelulárnym reakciám. V genóme octomilky sa Spätzle proteín nachádza v 3 rôznych alternatívach (Parker et al., 2001; Danihlík, 2011). U včely boli nájdené dva gény ortológne ku génom pre Spätzle proteíny (GB15688 a GB13503) (Evans et al., 2006; Danihlík, 2011). Výsledkom tejto signálnej transdukcie je translokácia NF- κ B transkripčných faktorov (napr. Dif/Dorsal a Rel1), ktoré tu aktivujú transkripciu AmP a iných génov kódujúcich imunitné efektory. Octomilka obsahuje tri NF- κ B transkripčné faktory (Relish, Dif, Dorsal), ktoré sú zahrnuté v podpore expresie špecifických AmP (Imler & Bulet, 2005; Lemaitre & Hoffmann, 2007; McMenamin et al., 2018). Vo včelom genóme sa nachádzajú dva hlavné transkripčné faktory podobné NF- κ B (Dorsal a Relish), ktoré sú zapojené v Toll a Imd signálnej dráhe (McMenamin et al., 2018). Na rozdiel od octomilky, včela nemá faktor Dif ale kóduje dve homológne formy faktoru Dorsal (dorsal-1 a dorsal-2), ktoré však nie sú ortológne s faktorom Dif, čo naznačuje, že Dif je odvodená vetva obsiahnutá len u niektorých rodov hmyzu. Táto signálna dráha spúšťa expresiu génov pre 1D-myo-inositol-3-fosfát lyasu (myo-inositol monofosfatasa, IMP, EC 5.5.1.4), ktorá je dôležitá v ochrane pred oxidačným stresom, ďalej melanizáciu a lyozómy. Toll signálna dráha je efektívna predovšetkým pre boj s grampozitívnymi (G^+) baktériami, vírusmi a hubovými patogénmi (Hillyer, 2016).

2.2.2.2 Imd dráha

Imd signálna dráha je podobne aktivovaná keď PAMP sa naviaže na extracelulárny receptor rozpoznávajúci peptidoglykany LC (PGPR-LC), ktorý je nutný pre odpoveď na bakteriálnu infekciu (Evans et al., 2006; Xu & Cherry, 2014; Cao et al., 2015). Toto indukuje intracelulárnu signalizáciu vedúcu k translokácií transkripčného faktoru NF- κ B rodiny, Relish a k transkripčnej aktivácii génov kódujúcich AmP a iné imunitné efektory (Hillyer, 2016). Imd dráha môže taktiež aktivovať časti JAK/STAT signálnej dráhy (Boutros et al., 2002; Danihlík, 2011), ktorej gény boli v genóme včely tiež identifikované (Evans et al., 2006; Danihlík, 2011). Okrem aktivácie Relish proteínu vedie Imd signálna dráha aj k aktivácii JNK signálnej dráhy, ktorej výsledkom je apoptóza prípadne melanizácia alebo regulácia expresie AmP (Evans et al., 2006; Danihlík, 2011). U včiel je Imd signálna dráha vysoko evolučne konzervovaná s pravdepodobnými formami pre všetky komponenty. Táto skutočnosť naznačuje, že Imd signalizácia je podobná ako u octomilky avšak to nemusí

znamenat', že majú aj podobné biologické role. Wojda et al., (2004) zistili, že táto dráha môže poskytnúť ako pozitívnu tak aj negatívnu spätnú väzbu pre expresiu AmP. Táto imunitná dráha je primárne efektívna v boji s gramnegatívnymi (G⁻) baktériami a vírusmi (Hillyer, 2016).

2.2.2.3 JAK/STAT

Podobne ako Toll signálna dráha je JAK/STAT dráha zapojená vo vývine aj v imunite (Hillyer, 2016). JAK/STAT dráha je aktivovaná vírovými časticami (Evans et al., 2006), čo pravdepodobne vedie k vysokej proliferácii hemocytov a následnému spusteniu fagocytózy (Daníhlík, 2011). U octomieliek je aktivovaná počas infekcie keď extracelulárny glykosilovaný cytokín „Unpaired“ (Upd) sa chová ako ligand a naviaže sa na bunkový receptor „Domeless“ (Dome). Dome je fosforylovaný nešpecifickou proteín-tyrozín kinasou (Hopscotch, JAK, EC 2.7.10.2), ktorý aktivuje proteín STAT. STAT dimerizuje a je translokovaný do jadra, čo aktivuje transkripciu génov kódujúcich proteíny s enzymovou aktivitou ako je napríklad synthasa oxidu dusnatého (NO synthasa, NOS, EC 1.14.13.39). Výsledkom je zvýšená fagocytická aktivita hemocytov (Evans et al., 2006). Gény pre Upd neboli v genóme včiel nájdené (Evans et al., 2006; Daníhlík, 2011). Homológne formy u včiel zahŕňajú cytokínový receptor Dome, kinázu JAK, transkripčný faktor STAT92E a dva negatívne regulátory – supresor cytokínovej signalizácie (SOCS) a inhibítor proteínov aktivovanej STAT (PIAS). Aj keď kľúčový ligand Upd nie je prítomný v genóme včiel, prítomnosť cytokínového receptoru gp130 homológneho k Dome naznačuje, že tento mechanizmus je bežný pre všetky druhy hmyzu a je plne aktívny ako u octomilky tak aj u včely medonosnej (Evans et al., 2006). JAK/STAT signálna dráha je zapojená v antimikrobiálnej a antivirálnnej odpovedi (Hillyer, 2016).

Toll, Imd a JAK/STAT dráhy sú prísne regulované. Ich aktivácia je iniciovaná naviazaním PAMP na PRR, avšak existujú intracelulárne negatívne regulátory, ktorých funkciou je udržiavať tieto dráhy pod kontrolou. Medzi tieto intracelulárne signálne molekuly patrí napr. SOCS a PIAS, ktoré negatívne regulujú a potláčajú spomínané Toll, Imd a JAK/STAT signálne dráhy (Lindsay & Wasserman, 2014; Myllymäki & Rämet, 2014).

2.2.3 Mechanizmy imunitných efektorových odpovedí

Deštrukcia patogénnych organizmov je sprostredkovaná prostredníctvom viacerých efektorových mechanizmov, medzi ktoré patria procesy ako fagocytóza, melanizácia, enkapsulácia, nodulácia, lýza mikroorganizmov, zničenie vírov sprostredkované RNAi, autofágia a apoptóza. Tieto mechanizmy sa vzájomne nevylučujú. Napríklad (1) patogény, ktoré boli melanizované v hlavnej telovej dutine zvanej hemocoel sú často následne fagocytované (Hillyer et al., 2003a; Hillyer et al., 2003b), (2) lytické aj melanizačné komponenty môžu byť prítomné na povrchu rovnakých patogénov (Hillyer & Christensen, 2005), (3) patogény po lýze sú občas melanizované (Osta et al., 2004; Volz et al., 2006), (4) enkapsulácia a nodulácia vo väčšine prípadov zahŕňajú agregáciu hemocytov a melanizáciu (Ratcliffe & Gagen, 1977; Pech & Strand, 1995).

2.2.3.1 Fagocytóza

Fagocytóza je evolučne konzervovaný bunkový imunitný proces, ktorý je využívaný stavovcami rovnako ako aj bezstavovcami pre deštrukciu malých cudzích organizmov. Tento mechanizmus je iniciovaný v momente keď je cudzí objekt rozpoznaný a naviazaný proteínmi v plazmatickej membráne fagocytu alebo je rozpoznaný PRR na povrchu bunky alebo sa humorálne PRR naviažu na PAMP. PRR, ktoré boli experimentálne dokázané, že sa účastia fagocytózy, zahŕňali proteíny obsahujúce thioesterovú skupinu, Nimrod proteíny, DSCAM, β -integríny a PGRP (Mamali et al., 2009; Hillyer, 2016). Cudzí objekt je následne pohltý za tvorby fagozómu, ktorý sa zlúči s lyzozómom a hydrolytické enzýmy rozložia objekt. Z hľadiska pohyblivosti hemocytov prebieha fagocytóza pomocou cirkulujúcich aj imobilných hemocytov (Hillyer & Strand, 2014). Z funkčného hľadiska, hemocytmi, ktoré fagocytujú patogény sú granulocyty u rodu *Lepidoptera*, *Hemiptera* a komárov, plazmatocyty u octomiliiek (Hillyer et al., 2003a; Hillyer et al., 2003b; Strand, 2008; Laughton et al., 2011; Hillyer & Strand, 2014; Honti et al., 2014). U včiel existujú rozdiely vo fagocytóze medzi jednotlivými kastami - fagocytická aktivita u kojičiek je vyššia ako u lietaviek a zimných včiel (Hystad et al., 2017). Väčšina hemocytov je fagocytujúca. Fagocytóza je veľmi rýchla odpoveď. U komárov, cirkulujúce a imobilné hemocyty začínajú fagocytovať len niekoľko sekúnd po zaregistrovaní patogénov (Sigle & Hillyer, 2016; Hillyer, 2016). Je to obnoviteľná odpoveď, ktorou hemocyty opakovane pohlcujú a degradujú

patogény, čím sa z hľadiska obnoviteľnosti odlišuje od melanizácie, pri ktorej sú produkované melanitické kapsule, ktoré zostávajú v hemocoeli hmyzu po zvyšok života (Hillyer, 2016).

2.2.3.2 Melanizácia

Melanizácia je enzymatický proces využívaný hmyzom pri vytvrdzovaní kutikuly, liečení rán a imunitných odpovediach (Christensen et al., 2005; Nappi & Christensen, 2005; Cerenius et al., 2008). V oblasti imunity je melanizácia mechanizmus imunitných efektorov, zahrnutý pri zneškodňovaní baktérií, hubových patogénov, protozoálnych parazitov, červov háďatiek a vajícok parazitických ôs. Taktiež napomáha pri odstraňovaní už uhynutých alebo umierajúcich patogénov (Osta et al., 2004; Volz et al., 2006). Procesy agregácie hemocytov, ako je nodulácia či enkapsulácia môžu byť sprevádzané melanizáciou. Pod pojmom melanizácia sa ukrýva séria reakcií, ktorá obsahuje konverziu tyrozínu na prekurzory melanínu a zosieťovanie proteínov pre vytvorenie vrstvy melanínu, ktorá obklopuje a izoluje patogén.

Melanizácia sa fenotypicky prejaví keď stmavnutá bielkovinová kapsula obklopí patogén, usmrtenie prebieha pravdepodobne pomocou oxidatívneho poškodenia alebo vyhladovania, pretože cudzí objekt je izolovaný od vysoko nutrične bohatej hemolymfy (Christensen et al., 2005; Nappi & Christensen, 2005; Cerenius et al., 2008). Proces zahŕňa koordinované interakcie medzi PRR, serínovými proteasami, inhibítormi serínových proteas a enzýmami regulujúcimi produkciu melanínu. Tento proces začína keď PRR rozpoznajú PAMP (Wang et al., 2005; Matskevich et al., 2010; Wang et al., 2014b). Toto iniciuje serín-proteasovú kaskádu, ktorá vrcholí aktiváciou enzýmov aktivujúcich pro-fenoloxidasu, ktorá štiepi tento zymogén na aktívnu formu fenoloxidasu (polyfenoloxidasový systém, EC 1.14.18.1) (An et al., 2009; An et al., 2011). Fenoloxidasa iniciuje produkciu melanínu hydroxyláciou tyrozínu za tvorby 3,4-dihydroxyfenylalanínu (DOPA), ktorý je oxidovaný fenoloxidasou na dopachinón a ten je konvertovaný na dopachróm (Christensen et al., 2005; Nappi & Christensen, 2005; Zhao et al., 1995). Dopachróm je následne enzýmovo prevedený na 5,6-dihydroxyindol za katalýzy fenoloxidasu oxidovaný na indol-5,6-chinón, ktorý je zosieťovaný s proteínmi hemolymfy pre vytvorenie melanitických kapsúl. V komplementárnej dráhe, aromatická L-aminokyselinová dekarboxylasa

(DOPA-dekarboxylasa, EC 4.4.4.26) hydroxyluje DOPA na dopamín, ktorý je prevedený na melanín pomocou fenoloxidasy a iných enzýmov (Hillyer, 2016). Mnohé z enzýmov a PRR, ktoré riadia melanizáciu sú produkované hemocytmi (Ashida et al., 1988; Hillyer et al., 2003a).

2.2.3.3 Bunková enkapsulácia

Enkapsulácia je bunková imunitná odpoveď využívaná pre elimináciu patogénnych organizmov, ktoré sú priveľké pre fagocytózu. Je typická pre larvy rodov *Dipteria* a *Lepidoptera* ako odpoveď na infekciu spôsobenú vajíčkami parazitických ôs. Pri rode *Lepidoptera* je enkapsulácia iniciovaná keď sa granulocyty spoja pre vytvorenie vrstvy buniek, ktoré obklopia patogén. Táto adhézia buniek nastáva spôsobom, ktorý je závislý na pripojení integrínov na špecifické miesta definované Arg-Gly-Arg (RGD) sekvenciou (Pech & Strand, 1995; Pech & Strand, 1996). Túto vrstvu granulocytov obklopí niekoľko vrstiev plazmocytov čo je nasledované pripojením ďalších granulocytov. V závislosti na druhu patogénu a hmyzu, kapsula môže byť melanizovaná (Hillyer, 2016).

2.2.3.4 Nodulácia

Nodulácia zahŕňa koordinovanú príľnavosť hemocytov spôsobom, že obklopujú veľké zhluky baktérií a je obvykle nasledovaná melanizáciou (Satyavathi et al., 2014). V tomto imunitnom procese, granulocyty priliehajú jeden k druhému a formujú tak vrstvy, ktoré obklopujú bakteriálne zhluky. Granulocyty vypustia svoj obsah, sekrečné granule, ktoré obalia baktérie vo flokulantnej kapsule. Flokulácia je proces, pri ktorom dve alebo viac koloidných častíc vytvorí agregát častíc viazaných slabými silami, tzv. vločkovanie. Plazmatocyty sa potom zhlukujú v okolí povrchu za tvorby nodulu a vo väčšine prípadov je celá štruktúra melanizovaná. Molekulárne mechanizmy prebiehajúce v tomto procese sú veľmi málo preskúmané avšak je známe, že nodulácia je závislá na signalizácii založenej na eikosanoïdoch t.j. trieda molekúl odvodených od 20-uhlíkatej polynenasýtenej mastnej kyseliny, najčastejšie kyselina arachidónová, ktoré zahŕňajú napríklad prostaglandíny (Stanley & Kim, 2019) a ďalej na proteíne zvanom Noduler, ktorý špecificky viaže komponenty bunkovej steny mikrobov (konkrétne kyselinu lipoteichoovú a β -1,3-glukány) (Gandhe et al., 2007; Hillyer, 2016).

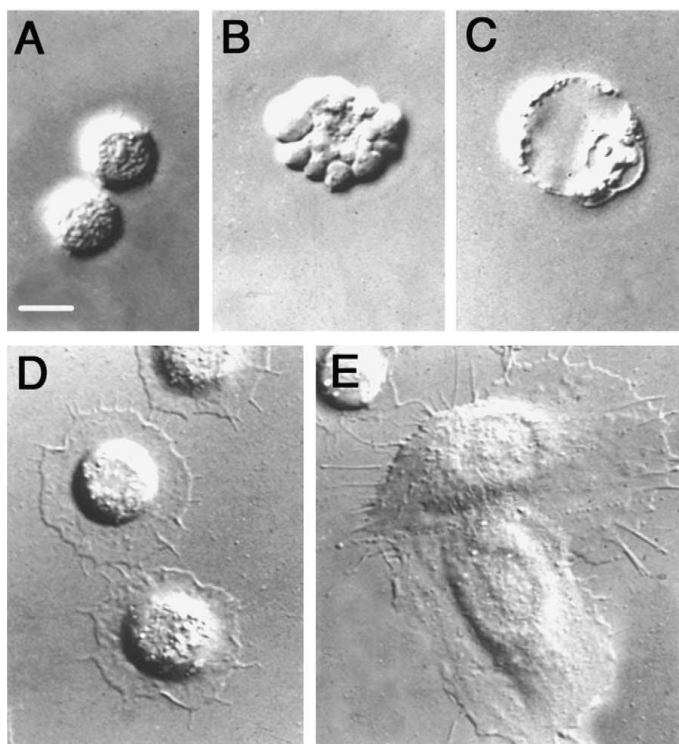
2.3 Hemocyty hmyzu

Hemocyty sú analógy ľudských bielych krviniek, u bezstavovcov, ktorých hlavnou telovou tekutinou je hemolymfa. Ich klasifikácia je predmetom sporu, vzhľadom na to, že terminológia jednotlivých typov hemocytov je často rôzna medzi rôznymi druhmi hmyzu. Viaceré štúdie však potvrdzujú, že aj keď sú bunky rôzne pomenované, majú podobnú alebo dokonca až rovnakú funkciu u rôznych druhov hmyzu (Ribeiro & Brehélin, 2006). Hemocyty môžu byť rozdelené podľa dvoch kritérií, jedným z nich je ich pohyblivosť a druhým sú ich funkčné vlastnosti. Z hľadiska ich pohyblivosti, hemocyty buď cirkulujú v obehu hemolymfy tzv. cirkulujúce hemocyty alebo sú prichytené k tkanivám tzv. prisadlé hemocyty (Strand, 2008; Hillyer & Strand, 2014; Hillyer, 2016). Toto rozdelenie je striktné založené na ich aktuálnom priestorovom stave, prisadlé hemocyty môžu byť uvoľnené do obehu, teda stať sa cirkulujúcimi a cirkulujúce hemocyty sa môžu prichytiť k tkanivám a stať sa prisadlými (Babcock et al., 2008; Márkus et al., 2009; King et al., 2012; Sigle & Hillyer, 2016).

Z funkčnej perspektívy má väčšina hmyzu viaceré subpopulácie hemocytov, ktoré sa líšia morfológiou a funkciou. Jednotlivé druhy sú tradične identifikované pomocou morfológických, histochemických a funkčných charakteristík (Jiravanichpaisal et al., 2006; Gábor et al., 2017) a medzi najčastejšie typy patria prohemocyty, granulocyty, plazmocyty, sférolocyty a oenocytoidy (Obr. 2). Tieto hemocyty boli popísané u viacerých radov hmyzu napríklad *Lepidoptera*, *Diptera*, *Orthoptera*, *Blattaria*, *Coleoptera*, *Hymenoptera*, *Hemiptera* a *Collembola* (Lavine & Strand, 2002; Gábor et al., 2017). V dnešnej dobe je už bežne používaná charakterizácia hemocytov pomocou monoklonálnych protilátok a genetických markerov. Napríklad v článku od Gábor et al., (2017) bola použitá metóda expresie hemolektínu, proteín nesúci homológne domény ľudského von Willebrandovho faktoru, ktorý je zahrnutý v procese koagulácie krvi a agregácie krvných doštičiek, ktorá odhalila jasnú funkčnú rozdielnosť medzi hemocytmi u *A. mellifera*.

Hemocyty spolu s profenoloxidasovým systémom (PPO systém) vykonávajú okamžitú odpoveď nešpecifickej imunity u hmyzu (Eleftherianos & Revenis, 2010; Negri et al., 2015). Hemocyty sú primárne mediátory bunkami riadenej imunity (Marmaras & Lampropoulou, 2009) pretože eliminácia organizmov, ktoré preniknú do telovej dutiny hmyzu, hemocoelu,

najprv vyžaduje aby boli bunky schopné rozpoznať a poskytnúť odpoveď na tieto patogény (Clark et al., 1997; Negri et al., 2015). Rozpoznanie prebieha priamou interakciou povrchových receptorov hemocytu s molekulami na povrchu cudzieho objektu alebo nepriamo rozpoznaním humorálnych receptorov, ktoré sa viažu a opsonizujú, označia ho pre sfagocytovanie (Gábor et al., 2017). V momente keď hemocyty rozpoznajú povrch patogénu ako cudzí objekt rýchlo sa transformujú z nepriľnavých buniek v pokojovom stave na aktivované priľnavé bunky, ktoré vytvoria vrstvu na povrchu cudzieho objektu (Nardi et al., 2006; Negri et al., 2016). Po rozpoznaní cudzieho objektu, prvou odpoveďou hemocytov je tzv. „spreading“ alebo šírenie hemocytov (Gillespie and et al., 1997; Negri et al., 2016). Táto vlastnosť hemocytov je často používaná pri určovaní miery funkčnosti imunitného systému v teste na sklenej podložke. (Dean et al., 2004). Veľkosť cudzieho objektu pri rozpoznaní hemocytom so „spreading“ schopnosťou ovplyvňuje výber mechanizmu pre jeho zničenie. Pri malej veľkosti ho hemocyty rozpoznajú a ďalej propagujú pre sfagocytovanie, ak je objekt veľký (alebo je viac malých objektov pokope) je hemocytmi smerovaný do procesu nodulácie alebo melanizácie. Tieto procesy prebiehajú kooperáciou mnohých hemocytov (Eleftherianos et al., 2009; Negri et al., 2016).



Obrázok 2: Päť typov hemocytov v Nomarského kontraste nájdených u rodu Lepidoptera ako *Pseudoplusia includens*. (A) Prohemocyty, (B) Sferulocyty, (C) Oenocytoidy, (D) Granulocyty a (E) Plazmatocyty. Mierka 50 μm . Prevzaté od (Lavine & Strand, 2002).

2.3.1 Hemocyty u včely medonosnej (*Apis mellifera*)

Vzhľadom na celosvetové obavy ohľadom zachovania zdravia populácii opel'ovačov, štúdie bunkovej imunity včely medonosnej obdržali prekvapivo extrémne málo pozornosti (Marringa et al., 2014). V posledných desaťročiach sa však upriamila pozornosť práve na túto zložku imunity včiel a na hlavného sprostredkovateľa, čím sú hemocyty. Jedno z prvých pozorovaní hemocytov u včiel bolo popísané v článku od de Graaf et al., (2002). Pomocou farbiacej techniky Giemsa odhalili v roku 2010 šesť typov, ktoré označili ako prohemocyty, plazmatocyty, oenocytoidy, granulocyty, koagulocyty a binukleárne bunky. Najpočetnejším typom boli plazmatocyty ďalej granulocyty a koagulocyty (El-Mohandes & Fawazy, 2010). V štúdiu z roku 2014, bolo jej autormi navrhnutá rýchla metóda štúdie hemocytických profilov. Použili prietokovú cytometriu v kombinácii s mikroskopickou analýzou pre popis bunkových komponent, ktoré našli v hemolymfe dospelého jedinca. Objavili permeabilné bunky, plazmatocyty a acelulárne častice (Marringa et al., 2014).

Včela medonosná patrí do skupiny holometabolických organizmov, v tých druhoch hmyzu sa bunkové elementy veľmi líšia v larválnom a dospelom štádiu života, a má eusociálny kastový systém (Schmid et al., 2008; Wilson-Rich et al., 2008; Laughton et al., 2011). V štúdií od Schmid et al. (2008), sa zaoberali počtom hemocytov v rôznych kastách ako boli robotnice, matky a trúdy. Z ich výsledkov vyplynulo, že vo všetkých troch fenotypoch sa počet hemocytov s vekom znižoval, teda redukcia počtu nie je špecifická vzhľadom na ich rolu v úli ale deje sa u všetkých fenotypov dospelého jedinca. Ďalej v štúdií od Wilson-rich et al. (2008), skúmali množstvo hemocytov pri procese enkapsulácie v štyroch rôznych vývinových štádiách jedinca, larva, kukla, kojička a lietavka. Objavili, že vývinové štádiá larvy a kukly mali väčší počet hemocytov ako dospelé jedince avšak žiadny rozdiel v procese enkapsulácie nezaznamenali. V roku 2015 Negri et al., prezentovali dáta zaoberajúce sa bunkovou imunitnou odpoveďou u tzv. „fifth instar larvae“ štádia (L5) a u čerstvo vyliahnutých robotníc (W). Pri ich pozorovaniach zistili, že hemocyty v týchto dvoch štádiách vykazovali odlišný vzhľad ako aj rozdielnosť pri priliehaní a spreading-u in vitro. Je zrejmé, že metamorfóza, ktorá nastáva medzi týmito dvoma štádiami má kľúčový podiel v bunkovej imunitnej odpovedi včely medonosnej.

O štyri roky neskôr v štúdií od Richardson et al., študovali hemocyty z obehu opäť u rôznych štádiách vývinu včely. Hlavné dva druhy hemocytov boli granulocyty a plazmatocyty. Po diferenciálnom farbení (použili hematoxylín a Eosín podľa protokolu Hema 3 Stat Pack (Fisher Scientific, Hampton, NH, USA)) boli granulocyty, dospelých robotníc aj lariev, pomerne veľké a okrúhle, s tmavofialovo zafarbenou cytoplazmou a obsahovali veľa vakuol, nie v zmysle ako sú prítomné v rastlinných bunkách, pravdepodobne išlo o kruhové objekty naplnené vzduchom. Okrem toho sa u lariev nachádzali bunky podobné granulocytom. Avšak po ofarbení pri mikroskopickom pozorovaní tieto bunky neobsahovali vakuolárne útvary a vykazovali asymetrický spreading podobný ako u plazmatocytov. Taktiež objavili veľa buniek, ktoré boli ťažko definovateľné alebo nespĺňali kritériá buniek nájdených u iných druhov hmyzu. Patrili sem napr. bunky, ktoré nazývajú ako permeabilné bunky. Mali vzhľad granulocytov a plazmatocytov keď podliehajú bunkovej lýze, bunkovej smrti alebo degranulácii a boli pozorované aj u lariev aj dospelých jedincov. Taktiež objavili veľké rozdiely v množstve jednotlivých typov hemocytov skrz kastami aj vývinovými štádiami. Množstvo plazmatocytov malo opačný

trend ako u granulocytov. Plazmatocyty sa nenachádzali u včiel v larválnom štádiu, najvyšší počet bol u čerstvo vyliahnutých dospelých jedincov a extrémne sa znížil u 5 a 10-dňových dospelých robotníc.

Do dnešnej doby bolo použitých mnoho metód pre identifikáciu typov hemocytov u včely medonosnej. Boli to metódy ako farbiace techniky, spomenuté vyššie, či metódy využívajúce väzbu lektínu. Lektíny sú skupina proteínov charakterizovaná schopnosťou selektívne viazať uhl'ovodíkové skupiny glykoproteínov (Kamei et al., 2020). Viaceré lektíny sa chovajú ako PRR vrodenej imunity u bezstavovcov (Praparatana et al., 2022). Rozoznávajú uhl'ovodíky vírových obalov, čo môže viesť k aktivácii viacerých imunitných mechanizmov, vrátane PPO kaskády a fagocytózy. Podľa metód využívajúcich väzbu lektínu boli hemocyty rozdelené rovnako do niekoľkých typov. Najpočetnejším sú plazmatocyty, ktoré sú rozdelené do štyroch podtypov P1-P4 na základe veľkosti a minoritné populácie iných buniek ako sú prohemocyty, granulocyty, oenocytoidy a koagulocyty (de Graaf et al., 2002; Gábor et al., 2017).

2.3.2 Hematopoéza

Hematopoéza je proces, pri ktorom hemocyty vznikajú a diferencujú sa. Životnosť hemocytov sa typicky pohybuje v rozmedzí od niekoľko dní až týždňov a je nevyhnutná ich neustála obnova. Potreba hemocytov sa mení v rámci vývoja a života včely, takže rýchlosť produkcie musí byť veľmi dobre adaptovaná variabilným podmienkam (Grigorian & Hartenstein, 2013). Produkcia hemocytov prebieha skrz všetkými štádiami vývinu jedinca.

Prvý vývin hemocytov sa odohráva u hmyzu počas embryogenézy z dorzálnej mezodermy (Tepass et al., 1994; Lavine & Strand, 2002). Dorzálna mezoderma je oblasť vo vajíčku, jeden z troch zárodočných listov, z ktorej sa napríklad u *D. melanogaster* vytvára srdce (Frasch, 1999). U hmyzu sa hemocyty tvoria v priebehu larválneho aj nymfálneho štádia, tj. štádium kedy má jedinec vzhľad plne vyvinutého dospelého jedinca avšak u krídlatých druhov chýbajú krídla. Deje sa to prostredníctvom členenia kmeňových buniek v hematopoetických orgánoch čo môže byť nasledované rozdelením už cirkulujúcich hemocytov (Ratcliffe et al., 1985; Lavine & Strand, 2002).

Lymfatické uzliny predstavujúce hematopoetické orgány hmyzu sú špeciálny druh tkaniva, z ktorého sú hemocyty generované a teda musia mať zásobu kmeňových buniek. Sú úzko asociované s chrbtovou cieovou, čo je hlavná štruktúrna komponenta obehového systému

hmyzu a prechádza cez hrud' a bruško na chrbtovej strane. Typicky tvoria prominentné párové orgány v mezothorakálnych (stredná časť hrudníka) a metathorakálnych (zadná časť hrudníka) segmentoch (Frasch, 1999; Grigorian & Hartenstein, 2013).

Hematopoéza v embryonálnom a nekompletne vyvinutom štádiu bola najviac popísaná u *D. melanogaster*. U embrya octomilky sú hemocyty produkované keď bunky z oblasti procefalického mezodermu diferencujú na plazmatocyty a kryštalové bunky, čo je pod kontrolou pomocou GATA transkripčným faktorov, čo je rodina proteínov, ktoré naväzujú sekvencie DNA (T/A)GATA(A/G) (Honti et al., 2014; Hillyer, 2016). Diferenciácia plazmatocytov, ktoré tvoria väčšinu populácie hemocytov, sa odohráva keď sú mezodermálne bunky vývojovo naprogramovaným spôsobom rozptýlené v celom embryu a vyžaduje to zapojenie transkripčných faktorov „Glial cells missing“ (Gcm) a „Glial cells missing 2“ (Gcm2). Diferenciácia kryštalových buniek zahŕňa mezodermálne bunky, ktoré sa zhromažďujú v okolí proventrikulu, oblasť medzi žalúdkom a medovým volátkom, a vyžaduje zapojenie transkripčného faktoru Lozenge a signálnej dráhy Notch. V larválnom štádiu sú hemocyty dotvorené v hematopoeatickom orgáne, teda hmyzích lymfatických uzlinách (Jung et al., 2005; Honti et al., 2014; Hillyer, 2016).

2.3.3 Migrácia hemocytov

Migrácia hemocytov smerom k zdroji infekcií a poraneným oblastiam je základná komponenta obranných reakcií hmyzu. V štúdiu od Merchant et al., (2008) bolo hypotetizované, že eikosaniody ovládajú bunkové imunitné odpovede hmyzu - viaceré štúdie toto tvrdenie potvrdili (Büyükgüzel et al., 2007; Durmuş et al., 2008; Stanley & Shapiro, 2007; Merchant et al., 2008).

Eikosaniody sú širokou skupinou látok, základné delenie je na tri hlavné skupiny látok ako sú prostaglandíny, kyselina epoxyeikosatrienová a lipogenasa. Štúdie viacerých výskumných skupín indikujú, že eikosaniody sú hlavnými mediátormi fagocytózy, mikroagregácie, tj. krok v procese nodulácie, ktorý je zodpovedný za odstraňovanie bakteriálnych buniek v obehovom systéme hmyzu. Ďalej sú eikosaniody zapojené aj do samotného procesu nodulácie, enkapsulácie či spreadingu buniek – napr. hemocytov (Stanley & Miller, 2006; Merchant et al., 2008; Stanley et al., 2009). Ich hlavnou úlohou je zrejme naviesť hemocyty k tvoriacim sa mikroagregátom hemocytov, nodulom a ranám.

Migrácia hemocytov je fundamentálna akcia u eukaryot aj prokaryot, čo zahŕňa aj bunky hmyzu (Baker et al., 2006; Jin & Hereld, 2006; Merchant et al., 2008). Boli postulované dve hypotézy (1) hemocyty hmyzu dokážu rozpoznať a migrovať za zdrojom infekcie (2) migrácia hemocytov je ovládaná eikosanoidmi, čo sú signálne molekuly tvorené enzymatickou alebo neenzymatickou oxidáciou kyseliny arachidónovej. Obe boli potvrdené v článku od Merchant et al., (2008) a aktivácia migrácie hemocytov tak môže u hmyzu zrejme prebiehať obomi spôsobmi.

2.4 Prehľad metód štúdia hemocytov

Štúdie v posledných desaťročiach upriamili pozornosť práve na bunkovú zložku imunity včiel a na hlavného sprostredkovateľa, čím sú hemocyty. Jedno z prvých pozorovaní hemocytov bolo už v 50. rokoch 20. storočia a u včiel bolo popísané v článku od de Graaf et al., (2002).

2.4.1 Všeobecná charakterizácia hemocytov

Klasifikácia hemocytov bola pôvodne založená na morfológických kritériách. V 80. rokoch 20. storočia boli podtypy hemocytov identifikované okrem morfológie taktiež pomocou histochemických a funkčných charakteristík (Gupta, 1985; Brehelin & Zachary, 1986) a o pár rokov neskôr boli identifikované protilátkové a genetické markery u vybraných druhov hmyzu, ktoré pomohli presnejšie odlišiť jednotlivé podtypy (Chain et al., 1992).

Pre jednoduché mikroskopické pozorovanie a charakteristiku podľa morfológie buniek ide využiť Normarského diferenčiacny interferenčný kontrast (Lavine & Strand, 2002). V štúdiu Ribeiro et al., (2006) využili pre štúdium hemocytov taktiež fázový kontrast. Po roku 2000 sa začalo viac využívať mikroskopické pozorovanie hemocytov využívajúce rôzne farbiace techniky, vrátane tých pre stanovenie životnosti buniek. Jednou zo štandardných metód farbenia pre klasifikáciu hemocytov je využitie Giemsa (Kadota et al., 2003) alebo May-Giemsa (Koiwai et al., 2017) farbív, ktoré spočívali v prieniku farbiva cez bunkovú membránu hemocytov a jeho pohltenie bunkovými štruktúrami – na základe nabitia a pH danej štruktúry vznikla škála sfarbení (od svetlo ružovej cez fialovú až po tmavo modrú), teda sú obe polychromatické (Piaton et al., 2015). Výsledky farbení avšak nie sú konzistentné a môžu byť ovplyvnené hodnotou pH, dĺžkou farbenia, vlhkosťou príp. ľudskou chybou. V roku 2004 využili Ling et al, pri pozorovaní hemocytv *B. mori* aj fluorescenčné sondy, akridínovú oranž a propium jodid, umožňujúce rozlíšiť podiel živých a mŕtvych hemocytv. Identifikácia tried hemocytov bola uľahčená mimo iné produkciou monoklonálnych protilátok pre rôzne typy hemocytov (Kurucz et al., 2003; Vilmos, 2004; Rus et al., 2006; Kurucz et al., 2007a; 2007b).

V roku 2021, (Moyetta et al.) urobili morfológickú a ultraštruktúrálnu charakterizáciu hemocytov u *Hematophagous Dipetalogaster maxima* a prvý krát využili prietokovú

cytometriu u bodavých ploštíc (tzv. „kissing bug“) pre zlepšenie klasifikácie bunkových populácií.

2.4.2 Metódy využité pre charakterizáciu hemocytov *Apis mellifera*

Do dnešného dňa boli využité viaceré metódy pri snahe identifikovať podtypy hemocytov u *A. mellifera*. Zahŕňali štandardné farbiace techniky ale taktiež analýzu na základe ich väzbových schopností lektínu (tzv. „lectin-binding assays“) (Gábor et al., 2017) pre ich charakterizáciu.

V roku 2010, (El-Mohandes & Fawazy), pomocou farbenia Giemsa preukázali prítomnosť prohemocytov, plazmatocytov, oenocytoidov, granulocytov, koagulocytov a binukleárnych buniek. Farbenie Giemsa spočíva v prieniku farbiva cez bunkovú membránu bunky, kde na základe pH štruktúry, ktorá ho pohltí vznikne škála farieb (od svetlo ružovej cez fialovú až po tmavo modrú). Farbivo Giemsa je teda polychromatické (Piaton et al., 2015).

Profilovanie hemocytov vykonali (Marringa et al., 2014) pomocou prietokovej cytometrie v spojení s Wrightovým farbením pre mikroskopiu. Prietoková cytometria pre delenie buniek spočíva v ožarovaní heterogénnej suspenzie buniek pomocou jedného alebo viacerých bodových laserov. Na základe svetla, ktoré je emitované z častíc je možné zistiť morfológiu buniek a rovnako aj bunkovú fyziológiu. Na základe kritérií zadaných používateľom je možné individuálne bunky zozbierať do homogenických frakcií. Výhodou prietokovej cytometrie je hlavne rýchlosť a čistota vzorky, ktorá sa blíži 100 % (Ibrahim & van den Engh, 2007). Spomenuté Wrightovo farbivo je typ Romanowského farbiva, ktoré spočíva v kombinácii kyslého aniónového farbiva Eosín Y a bazického kationového farbiva methylénová modrá. Je teda polychromatické, čo znamená, že vytvára rôzne sfarbenie (od ružovej cez fialovú až po modrú) v závislosti na pH štruktúry, ktorá ho pohltí (napr. jadro bude sfarbené na modro lebo obsahuje nukleové kyseliny (Giri, 2019). Vzhľadom na to, že jeho hlavnou zložkou je metanol, preparáty nevyžadujú fixáciu pred samotným farbením.

V roku 2017, (Gábor et al.) využili pre klasifikáciu hemocytov ich morfológiu a väzbové schopnosti lektínu. Podarilo sa im vyvinúť monoklonálnu protilátku (MAb), pomocou ktorej vo Western blot analýze detegovali proteín odpovedajúci hemolektínu *A. mellifera*, čo bolo potvrdené aj analýzou na hmotnostnom spektrometri. Hemolektín je dôležitou zložkou odvodenou od hemocytov, ktorá sa podieľa na zrážaní hemolymfy. Obsahu homológnu doménu k von Willebrandovmu faktoru – charakteristický proteín v krvi cicavcov,

podieľajúci sa na koagulácii a agregácii krvných doštičiek. Priniesli tak nový pohľad na klasifikáciu hemocytov a aj štúdium ich funkcií.

Pre charakterizáciu hemocytov včely medonosnej bola vytvorená, kolektívom Gábor v roku 2020, vytvorená ďalšia špecifická MAb pre molekulárne markery, ktoré sú exprimované rôznymi subpopuláciami hemocytov, podľa ich funkcie v rámci bunkovej imunity. Na základe toho vytvorili tri typy MAb, ktoré rozpoznávali odlišné triedy hemocytov hemocytov – melanizujúce bunky, agregujúce bunky a fagocytujúce bunky. Pre melanizujúce bunky, známe tiež ako oenocytoidy, navrhli protilátku pre PPO – tu by sa mali exprimovať hemocyty, pre ktoré sú typické procesy, ktoré sprevádza melanizačný proces (enkapsulácia, príp. nodulácia). Pre agregujúce bunky využili MAb vytvorenú v štúdiu z roku 2017, teda pre hemolektín. Nakoniec pre fagocytujúce bunky vytvorili špecifickú MAb cielenú na marker, ktorý je exprimovaný na granulocyty. Použitím kombinácie týchto protilátok je možná detekcia rôznych subtypov hemocytov, čo prináša nové možnosti ich štúdia (Gábor et al., 2020).

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Materiál a prístroje

3.1.1 Chemikálie

Fluka (Spojené kráľovstvo): Fluoresceín diacetát; Neutrálna červeň.

Lachner s.r.o. (Česká Republika): chlorid draselný.

Penta (Česká Republika): Chlorid sodný; Dihydrogénfosforečnan draselný.

Roth (Nemecko): Acetón; Giemsa.

Sigma-Aldrich (Nemecko): 1-fenyl-2-thiomočovina (PTU); Dihydrát hydrogénfosfátu sodného; Percoll; Propium jodid ; Trypanová modrá.

3.1.2 Prístroje a experimentálne vybavenie

Analytické váhy (Denver Instrument, Nemecko)

Centrifúga 5425 R, Centrifúga 5418 R, Centrifúga 5415 R (Eppendorf, Nemecko)

Digitálne predvážky (RADWAG, Poľsko)

Digitálny pH meter (XS Instruments, Taliansko)

Elektromagentická miešačka (Biosan, Litva)

Inkubátor 37°C pre včely

Inkubátor HS 122 A pre včely

Inkubátor nechladený EN120 (Nüve, Turecko)

Mikroskop AXIO Imager KM (ZEISS, Nemecko)

Mikroskop OLYMPUS BX50 (Olympus Optical, Japonsko)

Mikroskúmvky 0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml (Eppendorf, Nemecko)

Stereolupa binokulár (BEL Engineering, Anglicko)

Ultrazvuková vaňa (KRAINTEK s.r.o., Slovenská Republika)

Vortex V-1 plus (Biosan, Litva)

3.1.3 Biologický materiál

Vzorky včiel pochádzajú zo súkromnej včelnice Mgr. Jiřího Danihlíka, Ph.D z Valašského Meziříčí.

Inkubácia: 34,6 °C a 37 °C; Kŕmenie: 50% roztok sacharózy

3.2 Použité metódy

3.2.1 Príprava biologického materiálu

3.2.1.1 Odber hemolymfy zo zmrazeného a živého materiálu

Pre získanie extraktov zo zmrazených včelích lariev bol použitý modifikovaný postup od (Hiroyasu et al., 2018). Po rozmrazení boli larvy premyté v deionizovanej vode a prenesené pomocou pinzety na filtračný papier do suchej Petriho misky. Po čiastočnom uschnutí bola larva umiestnená pod binokulárnu lupu a pomocou pinzety bola porušená povrchová kutikula v mieste chrbtovej cievy. Po voľnom vytečení hemolymfy (HL) do Petriho misky bola odobratá pomocou automatickej pipety do 1,5 ml mikroskúmavky s fosfátovým pufrom (PBS) + 1% fenylthiomočovinou (PTU) . Boli urobené dve zriedenia HL v PBS s 1% PTU v pomere 1:10 a 1:5.

Postup pre prípravu extraktov zo zmrazených dospelých robotníč bol nasledovný. Po rozmrazení bola mŕtva včela prichytené za hrudník pinzetou. Pomocou manikúrových nožničiek jej bol odstrihnutý zadoček a pritlačením hrudníka medzi ukazovák a palcom bola vytlačená kvapka HL. Pomocou 10 µl automatickej pipety boli odobraté 2 µl HL do 1,5 ml mikroskúmavky s PBS s 1% PTU. Boli urobené dve zriedenia HL v PBS s 1% PTU v pomere 1:10 a 1:5.

Extrakcia HL živých dospelých robotníč prebiehala rovnako ako pri práci so zmrazenými dospelými robotnicami. Takto pripravená HL bola následne používaná pre zakoncentrovanie a purifikáciu HC. Všetky extrakty boli uchovávané na ľade.

Použité roztoky:

Fosfátový pufor (PBS): 500 ml – 4 g NaCl, 100 mg KCl, 902,5 mg Na₂HPO₄.2 H₂O, 120 mg KH₂PO₄; pH = 7,4

PBS s 1% PTU: 50 ml PBS s 1% PTU – 0,5 g PTU do 50 ml PBS (PTU bolo pridané pre zabránenie melanizácii a koagulácii HC – jedná sa o inhibítor fenoloxidasy (Zibae et al., 2011))

3.2.1.2 Purifikácia a zakoncentrovanie hemocytov

Prečistenie hemocytov (HC) prebiehalo centrifugáciou, testované boli dva spôsoby, na vrstve vysokohustotnej látky, konkrétne pomocou rôzne koncentrovaného roztoku Percollu (40 – 80 %) a ďalej štandardnou centrifugáciou (v tomto prípade bol odber HL robený do čistého PBS a pre zabránenie melanizácii boli použité kryštály PTU (Vašíček, 2009; Vacl, 2015)).

Centrifugácia na vrstve vysokohustotnej látky je založená na princípe rozdielnej hmotnosti častíc. Po navrstvení roztoku HL na roztok Percollu a následnej centrifugácii, častice s vyššou hustotou (hmotnosťou) klesnú na dno mikroskúmavky pričom HC zostanú nad vrstvou Percollu a vytvoria viditeľný prstenec (Maurer et al., 2022). Purifikácia na roztoku Percollu bola robená priamo po odbere HL.

Na 1400 μ l 60% roztoku Percollu bolo navrstvených 200 μ l roztoku HL v PBS s 1% PTU a nasledovala centrifugácia pri 500x g, 4°C a po dobu 30 minút. Následne bolo odobratých 95 μ l vrchnej frakcie supernatantu a 100 μ l prstenca suspenzie HC.

Pre druhú variantu purifikácie HC bola využitá centrifugácia pri 500x g, pri 4°C po dobu 5 minút. Následne po odobratí supernatantu bola získaná suspenzia HC.

Zhodnotenie úspešnosti purifikácie HC prebehlo mikroskopickým pozorovaním vo svetelnom poli (BF; z angl. bright field) (AXIO Imager KM (ZEISS, Nemecko)), porovnaním čistoty získanej suspenzie HC, kvality a počtu HC.

Použité roztoky:

Percoll: 40 – 80% roztok v deionizovanej vode (dH₂O)

3.2.2 Mikroskopické pozorovanie nefarbených hemocytov

Z HL v PBS s 1% PTU aj z purifikovanej suspenzie HC (z každej varianty) bolo odobratých 40 μ l na podložné sklíčko, ktoré bolo vopred očistené etanolom. Suspenzia HC bola prikrytá krycím sklíčkom a takto pripravený natívny preparát bol pozorovaný v BF (Olympus BX50 (Olympus Optical, Japonsko)) a pomocou Nomarského diferenciálneho interferenčného

kontrastu (DIC; z angl. differential interference contrast) (AXIO Imager KM (ZEISS, Nemecko)).

Pre zistenie počtu HC bola použitá Bürkerova komôrka, kde do priehlbiny komôrky bolo nanesených 20 μ l HL v PBS s 1% PTU či purifikovanej suspenzie HC a prikrytých krycím sklíčkom. Počítanie prebehlo v desiatich štvorcoch vrchnej rovnako aj spodnej mriežky Bürkerovej komôrky.

Boli dodržiavané nasledovné pravidlá. Bunky boli počítané v jednotlivých políčkach o ploche 0,04 mm² – ak sa nachádzali na čiarach počítali sa vždy len tie ktoré ležia na ľavej a hornej strane štvorcov, pre výpočet bolo vybraných aspoň 10 náhodných políčk. Pre výpočet buniek v 1 mm³ nariadenej suspenzie (x) bol použitý vzorec (Frébortová, 2008)

$$x = \left(\frac{\text{celkový počet buniek}}{\text{počet počítaných políčk}} \right) \times \left[\frac{1}{(\text{plocha štvorčeka} \times 0,1)} \right]$$

Natívne preparáty pre farbenie Giemsou boli pripravené zo suspenzie HC v pomere 1:5 (varianta 1) a z HL v PBS s 1% PTU v pomere 1:1 (varianta 2).

Pre prípravu fixovaných preparátov pre farbenie Giemsou v oboch verziách (naniesenie preparátu v podobe kvapky alebo jej rozter na podložné sklo) bolo rovnako použité zriedenie HL v PBS s 1% PTU 1:1. Taktiež bolo využité zriedenie 1:5 HL v PBS s 1% PTU následnou purifikáciou hemocytov na vrstve Percollu (500x g, 4°C, 30 minút) a následne prečistenie od roztoku Percollu. Suspenzia HC bola prenesená do čistej 1,5 ml mikroskúmavky a znovu prebehla centrifugácia (500 g, 4°C, 1 minúta). Bolo odobratých 70 μ l supernatantu, k peletu HC bolo pridaných 500 μ l PBS s 1% PTU a prebehla ďalšia centrifugácia (500 g, 4°C, 1 minúta). Následne bolo 500 μ l supernatantu odobratých do odpadu a k peletu bolo pridaných 70 μ l PBS s 1% PTU. Prvá verzia prípravy fixovaného preparátu (kvapka) bola pripravená naniesením 20 μ l suspenzie HC do stredu podložného skla bez následného rozteru. Druhá verzia fixovaného preparátu (rozter) bol pripravená taktiež naniesením 20 μ l suspenzie HC avšak na jednu stranu podložného skla a pomocou druhého skla bol urobený rozter. Následne bola urobená fixácia kde boli použité dve varianty. Pomocou čistého metanolu (3 minúty) alebo plameňom, pričom bolo podložné sklo za pomoci pinzety niekoľkokrát pretiahnuté

ponad plameň. Podložné sklo bolo opäť ponechané na vyschnutie, v prípade fixácie plameňom na vychladnutie pred farbením.

Natívny preparát pre farbenie NČ bol pripravený v dvoch verziách, a to bez premývania HL v PBS s 1% PTU a s premytím od balastných látok. Pre verziu bez premývania bola HL v PBS s 1% PTU zriedená v pomere 1:1. Vzorky HL v PBS s 1% PTU boli zmiešané s farbivom a prebehla inkubácia (5 minút, 25°C). Verzia po prečistení bola pripravená po odobratí 20 µl zo zmesi HL v PBS s 1% PTU s NČ a zvyšok zmesi bol zcentrifugovaný (500x g, 25°C, 1 minúta). Následne bolo odobraných 80 µl supernatantu a pridaných 80 µl PBS. Na podložné sklo bolo nanesených 20 µl.

Fixovaný preparát pre farbenie NČ bol pripravený v dvoch verziách. Na podložné sklo bolo nanesených 20 µl a aj kvapka aj rozter boli ponechané pre uschnutie. Takto pripravené sklá boli ponechané na vyschnutie. Fixácia prebehla metanolom v časovom intervale 3 minúty a následne boli preparáty opäť ponechané na vyschnutie pre farbením.

3.2.3 Mikroskopické pozorovanie farbených hemocytov

3.2.3.1 Giemsa farbenie

Giemsa (ROTH, Nemecko) je farbivo používané pre fixované preparáty. Je zmesou kyslých a bazických farbív, ktoré sa chovajú polychromaticky, v škále farieb od tmavofialovej cez ružovú po bledomodrú, vzhľadom na to aká štruktúra ho absorbuje (Piaton et al., 2015).

Pre natívny preparát varianty 1 aj 2, farbený pomocou farbiva Giemsa, boli pripravené zmiešaním 10 µl zásobného roztoku Giemsy a 30 µl suspenzie HC/HL v PBS s 1% PTU.

Inkubácia natívneho preparátu s farbivom prebiehala v rámci optimalizácie metódy v časových intervaloch 30, 40 a 60 minút.

Pre farbenie bolo vybrané riedenie farbiva Giemsa v dH₂O podľa pokynov dvoch výrobcov. Riedenie komerčného roztoku bolo teda realizované v pomere 1:20 (varianta 1) podľa ROTH a v pomere 1:9 (varianta 2) podľa Sigma Aldrich.

Pre farbenie fixovaných preparátov boli rovnako použité spomenuté dve varianty zriedenia farbiva Giemsa. Pomocou Pasteurovej pipety bolo k preparátu nanesené farbivo varianty 1 alebo varianty 2 tak aby bola uschnutá suspenzia pokrytá.

Rovnako pre čas inkubácie fixovaných preparátov preparátu boli vybrané v rámci optimalizácie tri časové intervaly, konkrétne 30, 40 a 60 minút.

Použité roztoky:

Giemsa farbivo – zásobné roztoky riedené v pomere 1:9 a 1:20 v dH₂O

3.2.3.2 Neutrálna červeň

Neutrálna červeň (NČ) (Sigma-Aldrich, Nemecko) je farbivo používané pre farbenie živých aj fixovaných preparátov, taktiež je možné ho použiť ako pH indikátor (zmena farby z červenej po žltú pri zvyšovaní zásaditosti roztoku). Pri farbení živých buniek sa farbivo viaže na lyzozómy a farbí ich na červeno (Ates et al., 2017).

Farbenie natívnych preparátov prebiehalo tak, že pridaných 2,5 µl zásobného roztoku o koncentrácii 0,4 % NČ k alikvótu HL v PBS s 1% PTU či suspenzie HC do celkového objemu 100 µl. Zmes bola jemne premiešaná a inkubovaná za tmy (5 minút, 25°C). Po uplynutom čase inkubácie bola zmes opäť jemne premiešaná a na podložné sklo, vopred očistené etanolom, bolo nanesených 20 µl. Pozorovanie v BF prebehlo ihneď. Zvyšok neofarbenej zmesi (80 µl) bol použitý pre verziu s prečistením od balastných látok. Následne prebehla centrifugácia (500 g, 25°C, 1 minúta) a bolo odobraté 70 µl supernatantu. K peletu bolo pridaných 80 µl PBS s 1% PTU a opäť prebehla centrifugácia (500 g, 25°C, 1 minúta). Znovu bolo odobraté 70 µl supernatantu a k peletu opäť pridané 80 µl PBS s 1% PTU. Pre pozorovanie v BF bolo na podložné sklo odobratých 20 µl ofarbenej suspenzie HC.

Fixovaný preparát bol pripravený rovnakým spôsobom ako farbenie Giemsou (podkapitola 3.2.3.1) v dvoch variantách (kvapka, rozter). Pozorovanie fixovaných preparátov HC po farbení NČ prebehlo v BF.

HC boli rovnako ako v prípade farbiva Giemsa počítané pomocou Bürkerovej komôrky. K vzorke o zriedení 1:1 bolo pridaných 0,5 µl NČ a k vzorke o zriedení 1:5 bolo pridaných 2,5 µl NČ. Inkubácia prebehla za tmy (25°C, 5 minút). Do priehlbiny v strede podložného skla bolo odobraných 20 µl vzorky a pozorovanie prebehlo v BF.

Použité roztoky:

Neutrálna červeň: 40 mg NČ, 10 ml dH₂O

3.2.3.3 Farbenie jadier hemocytov pomocou DAPI

4',6-diamidino-2-fenyindol (DAPI) je fluorescenčné farbivo, ktoré vytvára silné väzby s regiónmi DNA bohatými na A-T väzby. Je využívané napr. v cytogenetike pre farbenie jadier (Wallberg et al., 2016).

Pre prípravu natívneho preparátu pre farbenie jadier HC pomocou DAPI bolo použitá HL v PBS s 1% PTU v pomere 1:5 o celkovom objeme 50 μ l, ktorá bola prečistená na vrstve 60% Percollu (500x g, 4°C, 30 minút). Suspenzia HC bola najskôr inkubovaná s 1,25 μ l NČ v tme (25°C, 5 minút). Z ofarbenej suspenzie HC bolo odobratých 20 μ l na podložné sklo, rovnako aj do priehlbiny Bürkerovej komôrky, bol pridaný pracovný roztok DAPI v pomere 1 μ l farbiva na 100 μ l suspenzie. Prebehla inkubácia v tme po dobu 3 minút. Suspenzia bola prikrytá krycím sklíčkom a pozorovanie prebehlo pomocou fluorescenčnej mikroskopie a v BF (Olympus BX50 (Olympus Optical, Japonsko), hranol WD).

Použité roztoky:

Zásobný roztok DAPI: $c = 2,86 \mu\text{M}$

Pracovný roztok DAPI ($c = 1 \mu\text{g/ml} \approx 3,6 \mu\text{M}$): 1,3 μ l zásobného roztoku DAPI; 998,7 μ l PBS

3.2.4 Stanovenie životnosti hemocytov

3.2.4.1 Stanovenie životnosti pomocou FDA

Fluoresceíndiacetát (FDA) je zlúčenina, ktorá keďže je nepolárna, preniká membránou buniek pričom u živých buniek s aktívnym metabolizmom je premieňaný. Po vniknutí do bunky je pomocou intracelulárnych esteraz FDA hydrolyzovaný na fluoresceín, ktorý je polárny, takže neprechádza bunkovou membránou. Akumuluje sa v bunke kde vytvára zelenú fluorescenciu, ktorú je možné detegovať a kvantifikovať fluorimetricky, popr. pozorovať fluorescenčnou mikroskopiou (Yokohama et al., 1997).

Pre prípravu natívneho preparátu pre značenie živých buniek pomocou FDA bola použitá HL v PBS s 1% PTU v pomere 1:5 o celkovom objeme 50 μ l, ktorá bola prečistená na vrstve 60% Percollu (500x g, 4°C, 30 minút). Zo suspenzie HC bolo odobratých 20 μ l na podložné sklo a inkubácia prebehla v tme (25°C, 5 minút) s 5 μ l pracovného roztoku FDA. Suspenzia

bola prikrytá krycím sklíčkom a pozorovanie prebehlo pomocou fluorescenčnej mikroskopie a v BF (Olympus BX50 (Olympus Optical, Japonsko), hranol B).

Použité roztoky:

Zásobný roztok FDA: 5 mg FDA; 1 ml acetón

Pracovný roztok FDA: 0,3 µl zásobného roztoku FDA; 999,7 µl PBS

3.2.4.2 Stanovenie životnosti dvojitým farbením FDA/PI

Propium jodid (PI) je zlúčenina, ktorá naopak nepreniká neporušenou membránou živých buniek ale preniká porušenou membránou mŕtvych alebo umierajúcich buniek a tvorí červenú fluorescenciu. Je to DNA a RNA farbivo, teda farbí nukleové kyseliny vnútri mŕtvych buniek a je často využívané v imunohistochemii, prietokovej cytometrii a pri rozlišovaní apoptózy a nekrózy buniek. Je to teda farbivo pre vizualizáciu mŕtvych buniek s porušenou bunkovou membránou (Yokohama et al., 1997).

Procedúra, kde sa využíva PI v spojení s FDA pre determináciu životnosti buniek, sa nazýva ako „test dvojitého farbenia“. Živé bunky pri pozorovaní pod fluorescenčnom mikroskope svietia na zeleno pokým mŕtve bunky sú žiarivo červené. V bunkovej kultúre a cytotoxických štúdiách je dvojité farbenie s FDA/PI presná metóda pre rozlíšenie živých a mŕtvych buniek (Shi et al., 1995).

Pre prípravu natívneho preparátu pre dvojité farbenie bola použitá HL v PBS s 1% PTU v pomere 1:5 do celkového objemu 60 µl a v pomere 1:1 do celkového objemu 40 µl. HL v PBS s 1% PTU v pomere 1:5 bola prečistená na vrstve 60% Percollu. Suspenzia HC aj HL v PBS s 1% PTU (1:1) boli v 0,5 ml mikroskúmvke zmiešané s farbivom NČ v pomere 1:4 (NČ:suspenzia HC/HL v PBS) a inkubácia prebehla v tme (25°C, 5 minút). Následne bol pripravený preparát pre dvojité farbenie FDA/PI v dvoch variantách. Pre prvú variantu bolo na podložné sklo nanosených 50 µl pracovného roztoku FDA/PI, pridaných bolo 20 µl suspenzie HC/HL v PBS s 1% PTU. Inkubácia prebehla v tme v časovom intervale minimálne 3 minúty. Pre variantu 2 bolo na podložné sklo odobratých 20 µl suspenzie HC/HL v PBS s 1% PTU a pridaných 5 µl pracovného roztoku FDA/PI. Inkubácia v časovom intervale 5 minút prebehla v tme. Pozorovanie pre obe varianty bolo robené pomocou fluorescenčnej mikroskopie najskôr pre FDA a v BF (Olympus BX50 (Olympus Optical, Japonsko), hranol B (FDA) a G (PI)).

Použité roztoky:

Zásobný roztok FDA: 5 mg FDA; 1 ml acetón

Zásobný roztok PI: 10 mg PI; 1 ml PBS

Pracovný roztok FDA/PI (0,005 FDA mg/ml, 0,05 PI mg/ml): 3 µl zásobného roztoku FDA; 10 µl zásobného roztoku PI; 9987 µl PBS

3.2.4.3 Stanovenie životnosti pomocou Trypanovej modrej

Trypanová modrá (TB) je negatívne nabité vitálne azofarbivo. Toto farbivo neprestupuje bunkovou membránou živých buniek (ich membrána je negatívne nabitá, takže ho odpuďuje), takže zostanú neofarbené pričom mŕtve bunky s porušenou bunkovou membránou toto farbivo absorbujú a sú zafarbené na modro. Na rozdiel od PI nerozoznáva medzi nekrotickými a apoptickými bunkami. Je vhodné pre determináciu celkovej životnosti pozorovaných buniek v kultúre prípadne pre výpočet percenta úmrtia buniek po cytotoxickej stimulácii (Crowley et al., 2016).

Pre prípravu natívneho preparátu pre Bürkerovu komôrku bola použitá HL v PBS s 1% PTU v dvoch variantách, v pomere 1:5 do celkového objemu 50 µl (varianta 1) a v pomere 1:5 do celkového objemu 200 µl (varianta 2). Len varianta 2 bola prečistená na vrstve 60% Percollu (500x g, 4°C, 30 minút). Následne bolo 20 µl suspenzie HC aj HL v PBS s 1% PTU zmiešané v 1,5 ml mikroskúmavke so zásobným roztokom TB o koncentrácii 0,4 %, v pomere 1:1. Bez inkubácie, len po jemnom premiešaní bolo do priehlbiny Bürkerovej komôrky nanesených 20 µl. Pozorovanie a spočítanie živých a mŕtvych buniek prebehlo v BF.

Použité roztoky:

Zásobný roztok TB (0,4 %): 40 mg TB; 10 ml PBS

4 VÝSLEDKY

Cieľom experimentálnej časti bakalárskej práce bolo zaviesť a optimalizovať rutinný protokol izolácie a purifikácie hemocytov z hemolymfy dospelých včiel prípadne lariev pre následné analýzy bunkovej imunity včiel. Následne bola práca zameraná na vytvorenie protokolu pre mikroskopické pozorovanie hemocytov (HC) vrátane farbiacich techník pre zvýšenie kontrastu hemocytov pri ich pozorovaní v BF a ďalej pre stanovenie ich životnosti.

V rámci optimalizácie metód a tvorby rutinného protokolu pre izoláciu a purifikáciu hemocytov bol ako prvý riešený typ biologického materiálu pre odber hemolymfy (HL) zo živého či mŕtveho organizmu (dospelý jedinec, larva) a rôzne metódy pre jej purifikáciu a prípadné zakoncentrovanie – na základe centrifugačných techník, vrátane centrifugácie s vysokohustotnou látkou - roztokom Percollu, bežne používaného k izolácii buniek či organel (Horner et al., 2019).

Ďalej bola práca zameraná na mikroskopické pozorovanie HC v BF či s využitím DIC. DIC je technika svetelnej mikroskopie, ktorá funguje na základe rozdielneho indexu lomu častíc. Štruktúry s malým indexom lomu sa javia ako priehlbiny, naopak štruktúry s veľkým indexom lomu, mitochondrie a jadro, sa javia ako vyvýšeniny. Vytvára teda vysoko kontrastné až plastické zobrazenie živých buniek a iných priehľadných či nefarbených objektov. Výhoda DIC oproti fázovému kontrastu je, že nevytvára rušivý halo efekt (Stender, 2019).

Najskôr boli pozorované natívne preparáty odobranej HL v PBS s 1% PTU, či purifikovaná suspenzia HC, rovnako v PBS s 1% PTU. Ďalej boli využité farbiace techniky s NČ a farbivom Giemsa, aby sa podporil kontrast pozorovaného preparátu. Pre farbenie boli využité nie len natívne ale taktiež aj fixované preparáty. Okrem toho prebiehala aj úprava purifikácie HC v nadväznosti na kvalitu následne pripravovaných fixovaných preparátov.

Pre základné charakteristiky HC, tj. ich čistotu a intaktnosť či naopak popraskanie bolo využité ich pozorovanie svetelnou mikroskopiou. Pre stanovenie počtu HC bola použitá Bürkerova komôrka. Je to špeciálne podložné sklíčko, ktoré má v strede priehlbinu a odtokový žliabok v tvare H. Do priehlbiny sa pipetuje suspenzia buniek. Následným

prikrytím pomocou špeciálneho krycieho skla je roztok rovnomerne rozložený a vznikne priestor o hĺbke 0,1 mm. V oblasti nad a pod priehlbínou sa nachádza „komôrka“ zložená z 9 veľkých štvorcov ($a_1 = 1$ mm), každý z nich je rozdelený dvojitémi čiarami na skupinu 16 malých štvorcov ($a_2 = 0,2$ mm) a v ich rohoch sú malé štvorčeky ($a_3 = 0,05$ mm) (Frébortová, 2008). Bolo vybratých náhodných 5 štvorcov z vrchnej a 5 štvorcov zo spodnej mriežky. Mikroskopické pozorovanie hemocytov bolo rovnako využité pre stanovenie životnosti pomocou fluorescenčnej mikroskopie (AXIO Imager KM (ZEISS, Nemecko)) s využitím fluorescenčných sond, fluoresceíndiacetátu (FDA), propium jodidu (PI) a ďalej farbiacej techniky využívajúcej Trypanovú modrú (TB) s následným pozorovaním vo svetelnom poli.

Pre väčšinu experimentov boli využité živé včely zimnej generácie, konkrétne robotnice. Pre počiatočný výber vhodného biologického materiálu boli využité zamrazené včely a ich larvy z letnej generácie (skladované pri -60°C).

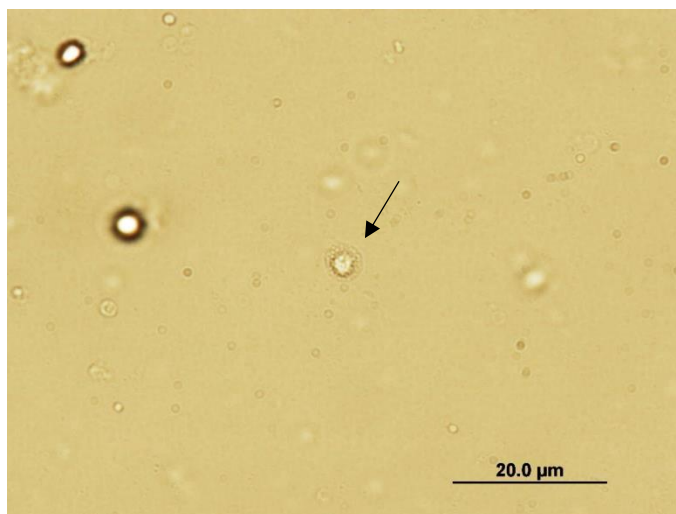
4.1 Optimalizácia izolácie a purifikácie hemocytov

4.1.1 Odber hemolymfy pre purifikáciu hemocytov

Prvým krokom pre izoláciu hemocytov je odber hemolymfy zo včiel, prípadne ich lariev. Najskôr bolo testované, či je nutné pracovať len so živým materiálom, či nie je možné využiť čo by už zmrazený materiál, čo by vzhľadom na zimné obdobie poskytlo výhodu v neobmedzenosti dostupnosti vzoriek.

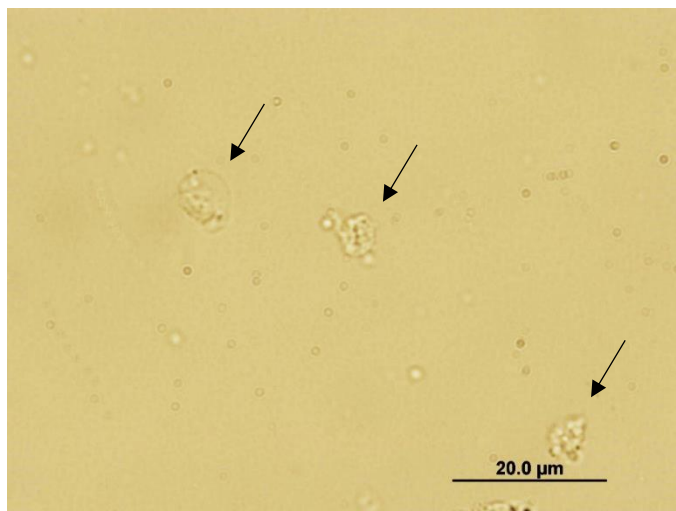
Už pri samotnom odbere hemolymfy z rozmrazených lariev podľa protokolu (Hiroyasu et al., 2018) bolo možné pozorovať neideálnu konzistenciu biologického materiálu. Larvy po premytí a osušení neboli kompaktné, nedržali pevný tvar a prechádzali až do kašovitej konzistencie a pri uchytení larvy do pinzety dochádzalo k nechcenému porušeniu jej kutikuly, ktoré interferovalo následným odberom hemolymfy. Pri pokuse o porušenie kutikuly boli v dôsledku kašovitej konzistencie porušené aj iné štruktúry larvy a hemolymfa obsahovala aj ďalšie zložky, ktoré ju znečistili. Práca s larvami bola teda nie len náročná z pohľadu manipulácie s nimi, ale odoberaná hemolymfa bola znečistená radom artefaktov. Pri mikroskopickom pozorovaní sa navyše ukázalo, že hemocyty v odobratej hemolymfe v PBS s 1% PTU (zriedenie 1:10; 1:5) nie sú intaktné, ale naopak popraskané (Obr. 3) – zrejme v dôsledku zmrazenia biologického materiálu. Z týchto dôvodov bola práca

so zmrazeným materiálom neideálna a bolo nutné pokračovať experimenty so živým biologickým materiálom.



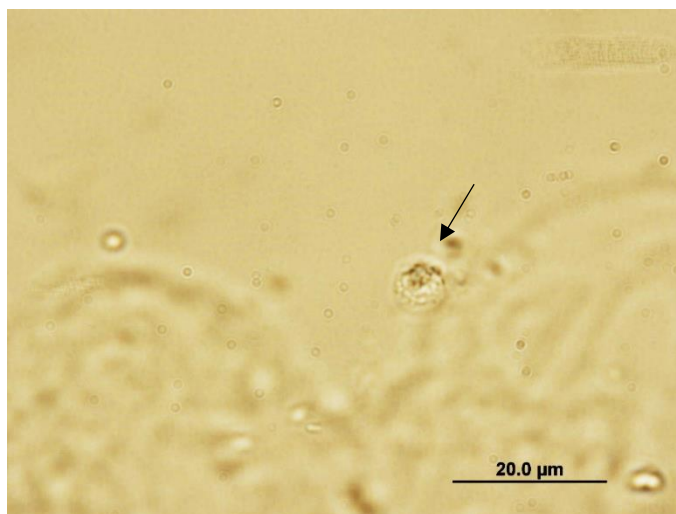
Obrázok 3: HC prítomné v HL odobratej zo zmrazených lariev (odber do PBS s PTU v pomere 1:10 (HL:PBS)), neprečistená HL (BF, 600x).

Odber hemolymfy u zmrazených dospelých robotníc bol menej komplikovaný v porovnaní s odberom hemolymfy zmrazených lariev. Štruktúra dospelých včiel omnoho kompaktnejšia. Hemolymfa bola v rámci optimalizačných krokov odobratá do PBS s 1% PTU a to v pomere 1:10 do finálneho objemu 100 μ l a 1:5 do finálneho objemu 200 μ l. Z takto pripravenej hemolymfy boli následne pripravené natívne preparáty, ktoré boli pozorované v BF. Ukázalo sa, že integrita jednotlivých hemocytov bola poškodená (Obr. 4) - bunky boli popraskané. Z týchto dôvodov bude aj v prípade dospelých robotníc bude nutná práca so živým materiálom.



Obrázok 4: HC prítomné v HL odobratej zo zmrazených dospelých robotníc (odber do PBS s PTU v pomere 1:5 (HL:PBS)), neprečistená HL (BF, 600x).

Pri odbere HL dospelých živých robotníc bola práca sťažovaná len pohybom včiel, ktoré boli pri väčšom počte včiel uspané na ľade. Kvalita v podobe intaktnosti HC bola pri tejto variante najlepšia (Obr. 5). Vzhľadom k prítomnosti rady ďalších zložiek v HL včiel je analýzu HC a ich procesov vhodné pracovať s purifikovanou frakciou HC

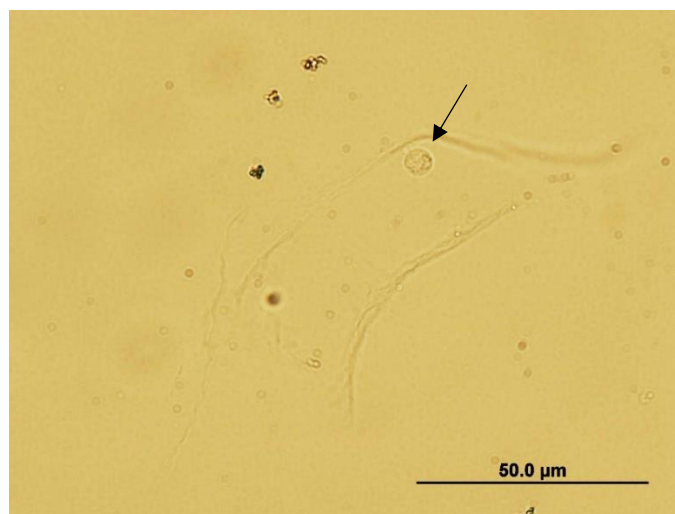


Obrázok 5: HC prítomné v HL odobraté zo živých dospelých robotníc (odber do PBS s PTU v pomere 1:5 (HL:PBS)), neprečistená HL (BF, 600x).

4.1.2 Spracovanie hemolymfy pre purifikáciu hemocytov

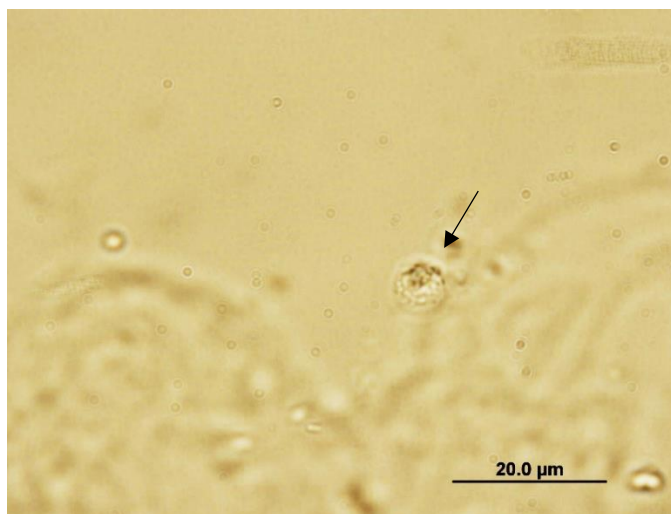
Hemolymfa hmyzu sa všeobecne odoberá do vhodného prostredia s obsahom látky inhibujúcej humorálnu odpoveď, predovšetkým melanizačnú kaskádu, a to prídavkom inhibítora fenoloxidasy (Zibae et al., 2011). V tejto práci bola hemolymfa odoberaná do fosfátového pufru (PBS) o pH = 7,4 s obsahom 1% PTU. Parameter, ktorý v tomto kroku môže byť vzhľadom k následným analýzám rôzne optimalizovaný, je v akom pomere hemolymfy s PBS miešať. Konkrétne boli skúšané podmienky riedenia hemolymfy v PBS s 1% PTU v pomere 1:10 do celkového objemu 100 a 200 μ l a v pomere 1:5 do celkového objemu 100 a 200 μ l. Rozdiel v testovanom finálnom množstve nariadenej hemolymfy bol vzhľadom k ich vhodnosti pre ďalší krok purifikácie HC tj. ich prečistenie a zakonzentrovanie na vrstve Percollu o vybranej koncentrácii (Parrinello et al., 2020).

Ako prvé boli vykonané pilotné skúšky vhodného zriedenia HL a to v pomere 1:10, HL z 5 včiel (z jednej včely bolo vždy odoberané po 2 μ l HL), a 1:5, hemolymfy z 10 včiel, o celkovom objeme 100 μ l. Pri zriedení HL v PBS s 1% PTU v pomere 1:10, boli HC v zornom poli mikroskopu viditeľné, avšak vzhľadom k neprečistenej HL bol pozorovaný aj balastný obsah (Obr. 6).



Obrázok 6: HC prítomné v HL odobratej zo živých dospelých robotníc (odber do PBS s PTU v pomere 1:10 (HL:PBS)) v 100 μ l, neprečistená HL (BF, 400x).

Koncentrovanejšia vzorka (zriedenie HL v PBS s 1% PTU v pomere 1:5) poskytla podľa očakávania väčší výskyt HC, avšak aj väčší výskyt balastu, ktorý rušil mikroskopické pozorovanie (Obr. 7).



Obrázok 7: HC prítomné v HL odobratej zo živých dospelých robotníč (odber do PBS s PTU v pomere 1:5 (HL:PBS)) v 100 μ l, neprečistená HL (BF, 600x).

Pre purifikáciu HC pomocou centrifugácie s vysokohustotnou látkou (Percoll) bolo najskôr testované vhodné východiskové zriedenie HL v PBS s 1% PTU. Najskôr prebehol výber vhodné zriedenia HL pričom bolo použité zriedenie HL v PBS s 1% PTU v pomere 1:10 a 1:5 o celkovom objeme 200 μ l. Objem riedenej HL bol navýšený na 200 μ l z dôvodu lepšej manipulácie so vzorkou po centrifugácii a lepšej viditeľnosti prstenca HC. Pre prvotnú skúšobnú separáciu HC bola zvolená centrifugácia HL v PBS na 60% roztoku Percollu. Hlavným rozhodujúcim kritériom výberu zriedenia HL v PBS s 1% PTU bola viditeľnosť prstenca (suspenzia s obsahom zahustených HC). Pri zriedení HL v PBS s 1% PTU v pomere 1:10 nebol prstenec vôbec viditeľný (za týchto podmienok bez prechádzajúceho farbenia), kvôli čomu bola nasledujúca práca znemožnená, pretože nebolo možné určiť kde sa HC nachádzajú a odkiaľ ich odobrať. Naopak pri zriedení HL v PBS s 1% PTU v pomere 1:5 bol prstenec už dobre viditeľný, vďaka čomu sme mohli HC odobrať a pokračovať v optimalizácii ich purifikácie.

Následne bol testovaný výber vhodnej koncentrácie Percollu, na ktorého vrstve sú hemocyty pri centrifugácii zachytávané. Pre všetky koncentrácie roztoku Percollu (40 – 80 %) bolo použité zriedenie HL v PBS s 1% PTU v pomere 1:5 o celkovom objeme 200 µl. Roztok HL bol navrstvený krúživými pohybmi na roztok Percollu o požadovanej koncentrácii v pomere 1:7 (HL:Percoll) a takto pripravená zmes bola centrifugovaná (500 g, 4°C, 30 minút). Pre získanie purifikovanej suspenzie hemocytov bolo pomocou automatickej pipety odobratých 95 µl vrchného supernatantu (PBS bez obsahu buniek) do odpadu a ďalších 100 µl supernatantu (purifikovaná suspenzia HC) bolo odobratých do 0,5 ml mikroskúmavky a uchovávaných na ľade pre ďalšiu prácu.

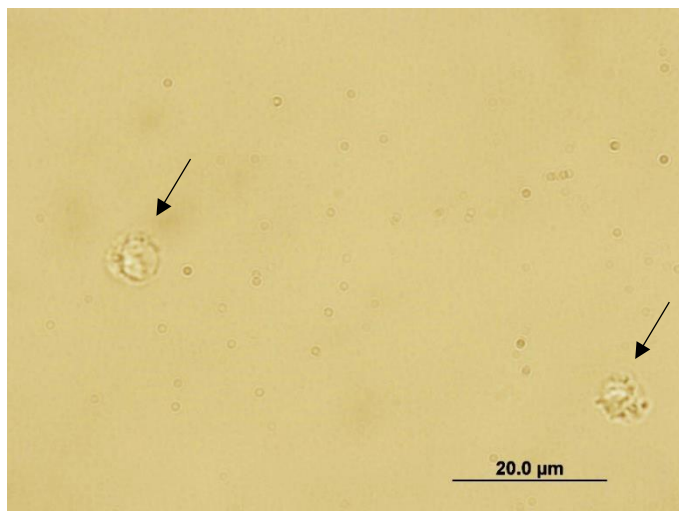
4.1.3 Purifikácia a zakoncentrovanie hemocytov

4.1.3.1 Purifikácia hemocytov na vrstve Percollu

Roztok Percollu je nástroj pre efektívnu hustotnú separáciu, používaný pre izoláciu buniek, organel a vírov. Je zložený z koloidných častíc oxidu kremičitého o priemere 15-30 nm, ktoré sú obalené v polyvinylpyrolidíne. Jeho hlavnou výhodou je nízka viskozita v porovnaní s alternatívami, nízka osmolarita a žiadna toxicita voči bunkám. Centrifugácia na vrstve Percollu je založená na princípe rozdielnej hustote (hmotnosti) častíc (Maurer et al., 2022). Po navrstvení roztoku HL na roztok Percollu a následnej centrifugácii, častice s vyššou hustotou (hmotnosťou) klesnú na dno mikroskúmavky pričom HC zostanú nad vrstvou Percollu a vytvoria viditeľný prstenec. Purifikácia na roztoku Percollu bola robená po priamo po odbere HL.

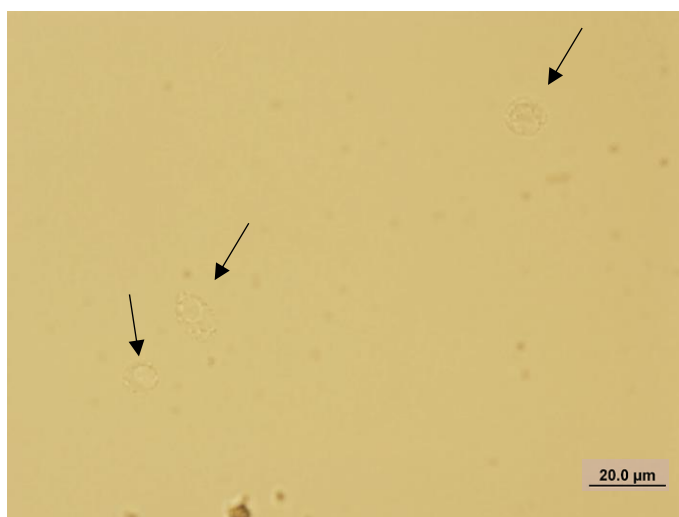
Pre purifikáciu hemocytov využívajúcej centrifugáciu na vrstve Percollu boli pri pilotnom testovaní metodiky purifikácie HC využitá koncentrácia 40 % a 60 %. Následne bolo robené testovanie rôznych koncentrácií Percollu pre nájdenie najoptimálnejších podmienok separácie hemocytov. Medzi testované koncentrácie Percollu patrili 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % a ich účinnosť vzhľadom k počtu HC ich intaktnosti a viditeľnosti bunkovej membrány bola porovnávaná mikroskopicky vo svetelnom poli.

Koncentrácia Percollu 40 % bola zopakovaná kvôli dobrým výsledkom v pilotných testovaniach. Vo svetelnom boli HC dobre viditeľné, s ostro ohraničenou bunkovou membránou (Obr. 8).



Obrázok 8: HC získané purifikačným procesom na vrstve 40% Percollu – HL bola pre purifikáciu HC odobraté zo živých dospelých robotníc (odber do PBS s PTU v pomere 1:5 (HL:PBS)) (BF, 600x).

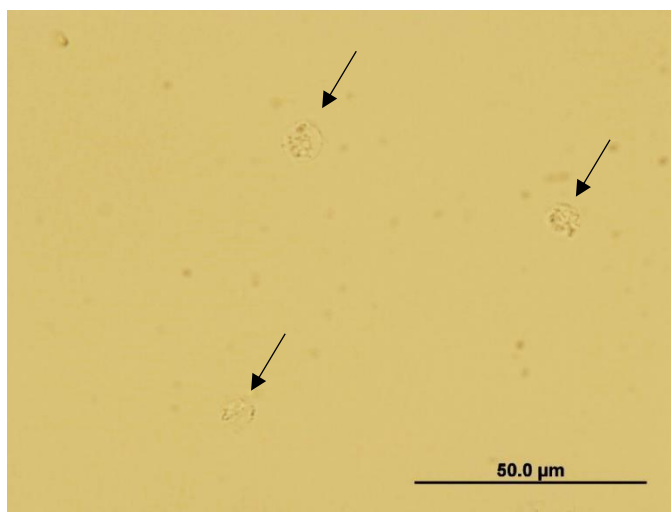
Pri koncentrácii Percollu 50 % neboli HC dobre viditeľné a ich počet bol porovnateľný so 40% roztokom Percollu (Obr. 9).



Obrázok 9: HC získané purifikačným procesom na vrstve 50% Percollu – HL bola pre purifikáciu HC odobraté zo živých dospelých robotníc (odber do PBS s PTU v pomere 1:5 (HL:PBS)) (BF, 1000x).

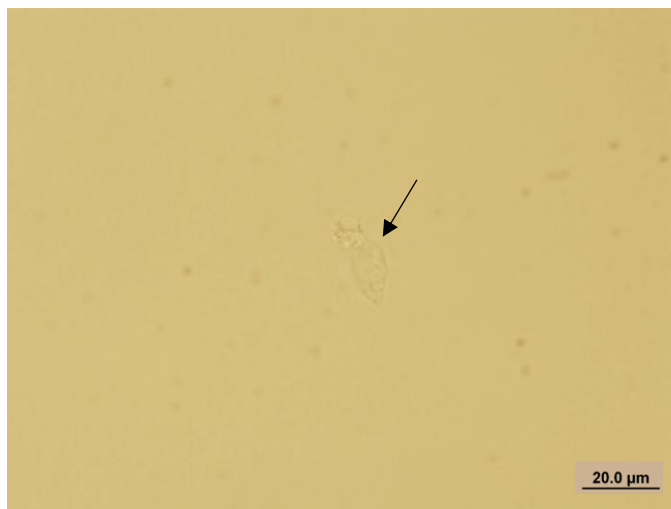
Koncentrácia Percollu 60 %, taktiež použitá v pilotných testoch, mala pri porovnaní s ostatnými testovanými koncentraciami Percollu poskytnúť najlepšie výsledky. HC boli dobre

viditeľné, intaktné s ostro ohraničenou bunkovou membránou (Obr. 10) Na vrstve takto koncentrovaného Percollu bol prstenec so suspenziou hemocytov stabilnejší a lepšie sa odoberal, takže získaný počet HC bol podľa pozorovania jednotlivých zorných polí vyšší.



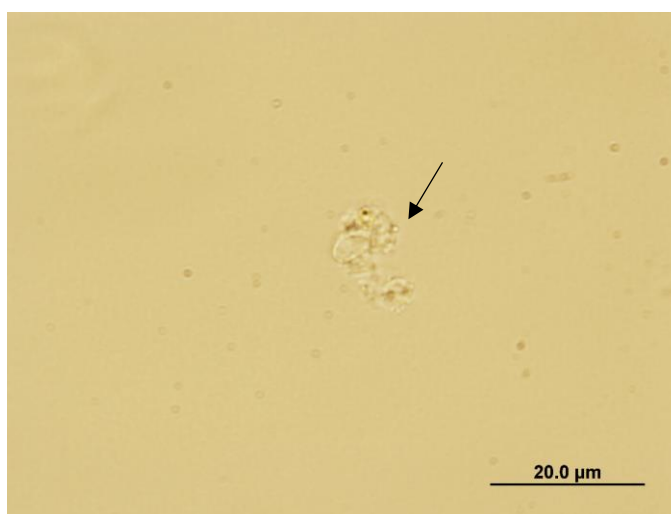
Obrázok 10: HC získané purifikačným procesom na vrstve 60% Percollu – HL bola pre purifikáciu HC odobraté zo živých dospelých robotníc (odber do PBS s PTU v pomere 1:5) (HL:PBS)) (BF, 400x).

Pri koncentrácii Percollu 70 % sa vo vzorke nachádzal veľmi malý výskyt HC v porovnaní s ostatnými koncentráciami roztoku Percollu, pričom sme očakávali naopak vyšší výskyt HC prípadne aj iných častíc. Síce je Percoll látka s nízkou osmolaritou je možné, že pri vyšších koncentráciách by nejakým spôsobom mohla hemocyty ovplyvňovať. Purifikované HC však neboli intaktné a naopak mali neostrú bunkovú membránu (Obr. 11).



Obrázok 11: HC získané purifikačným procesom na vrstve 70% Percollu – HL bola pre purifikáciu HC odobraté zo živých dospelých robotníč (odber do PBS s PTU v pomere 1:5 (HL:PBS)) (BF, 1000x).

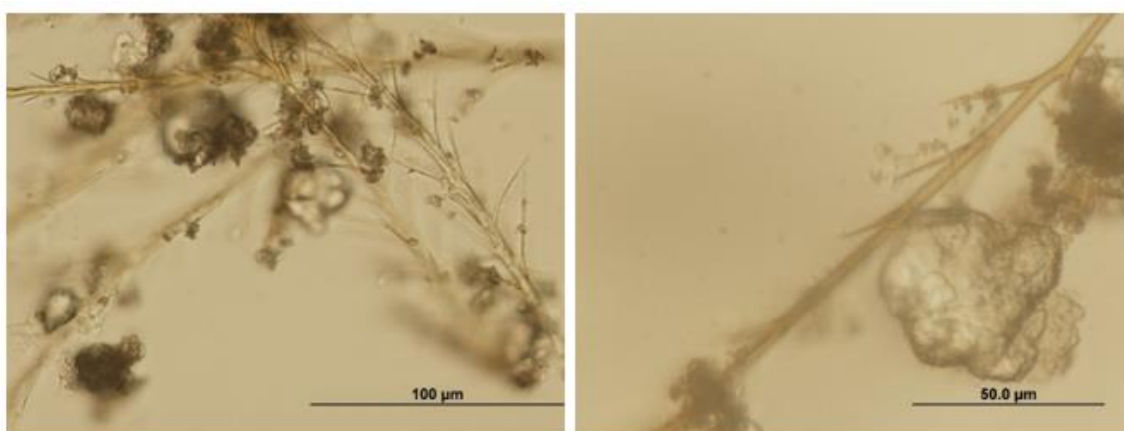
Pri poslednej koncentrácii Percollu 80 % sa objavili najväčšie problémy. Výskyt HC v porovnaní s ostatnými koncentráciami roztoku Percollu bol veľmi nízky a objavil sa výskyt balastných látok. Rovnako ako pri koncentrácii Percollu 70 % bola táto koncentrácia Percollu pravdepodobne príliš vysoká. V prípade nájdenia nejakých buniek, boli neintaktné, popraskané, nekvalitné a veľmi zle viditeľné (Obr. 12).



Obrázok 12: HC získané purifikačným procesom na vrstve 60% Percollu – HL bola pre purifikáciu HC odobraté zo živých dospelých robotníč (odber do PBS s PTU v pomere 1:5 (HL:PBS)) (BF, 600x).

4.1.3.2 Purifikácia hemocytov klasickou centrifugáciou

Pre túto variantu purifikácie bola HL odoberaná do čistého PBS a bol zvolený iný spôsob zabránenia melanizácie HL, pridaním kryštálikov PTU (Vašíček, 2009; Vacl, 2015). Následne bola urobená centrifugácia pri 500x g, 4°C po dobu 5 minút. Tento postup bol použitý pre dve zriedenia HL v PBS, a to v pomere 30 μ l roztoku HL ku 50 μ l PBS (Obr. 13, a) a v pomere 50 μ l roztoku HL ku 50 μ l PBS (Obr. 13, b). V oboch zriedeniach bolo v BF zaznamenané veľké množstvo nečistôt, balastného obsahu a nerozpustených kryštálikov PTU (Obr. 13 a, b). Z týchto dôvodov nebol tento postup purifikácie ďalej používaný.



a)

b)

Obrázok 13: Prečistenie HL - kryštály PTU - a: zriedenie 30:50 (HL:PBS) (BF, 200x), b: zriedenie 50:50 (HL:PBS) (BF, 400x).

4.2 Farbenie hemocytov pre mikroskopické pozorovanie

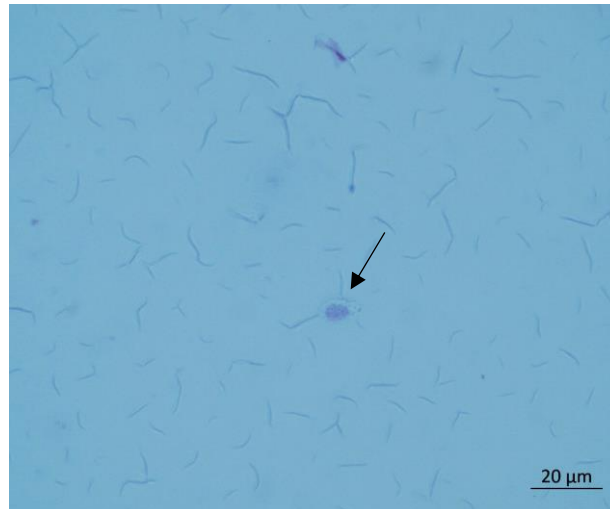
4.2.1 Giemsa farbenie

Giemsa je farbivo nukleových kyselín používané v cytogenetike, pri histopatologickej diagnostike aj pri tvorbe karyogramu. Je zmesou bazického farbiva methylová modrá a kyslých farbív eozín a Azure B. Je založené na špecificke pre fosfátové skupiny v DNA, viaže sa na oblasti s vysokým obsahom väzieb thymín-adenín. Je to farbivo polychromatické, čo znamená, že vytvára rôzne sfarbenie v škále od modrej cez ružovú až tmavofialovú v závislosti na štruktúre a pH komponent bunky, ktorá ho pohltí (pr. cytoplazma lymfocytov – nebeská modrá, cytoplazma monocytov – svetlá modrá, jadro – tmavo modrá, trombocyty – svetlá ružová, chromatín – magenta, erytrocyty – ružová) (Piaton et al., 2015). Giemsa je často používaná s Wrightovým farbivom kedy tvorí tzv. Wright-Giemsa farbivo a slúži pre

diferenciálne farbenie pre rozoznanie rôznych typov buniek – v rade štúdií zaoberajúcimi sa imunitou hmyzu je toto farbenie používané (Yu et al., 2016; Zhang & Zhang, 2021).

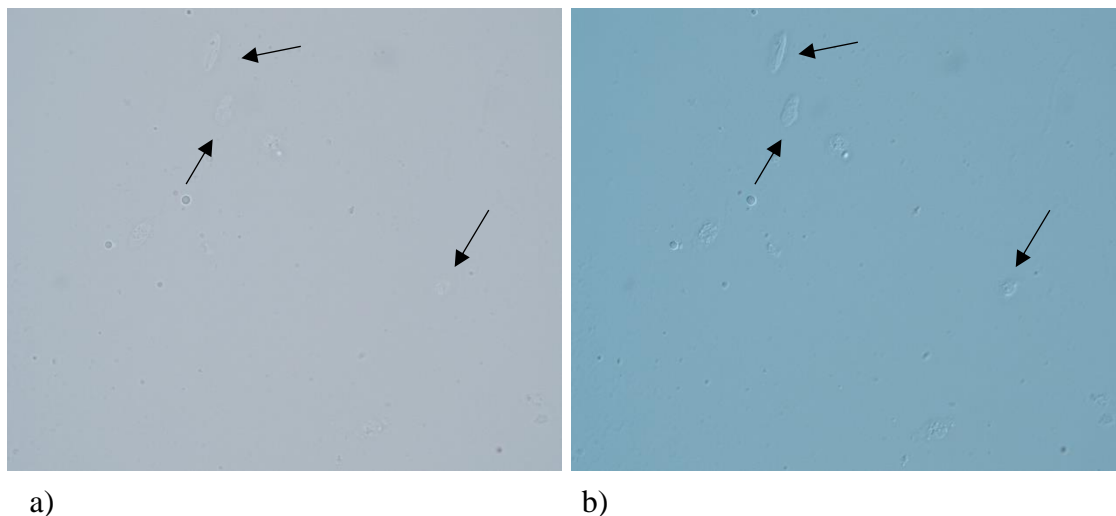
Po optimalizácii najvhodnejšej prípravy vzoriek HL či suspenzie HC pre ich následné analýzy bolo testované Giemsa farbenie pre zvýšenie kontrastu HC pri mikroskopickom pozorovaní vo svetelnom poli. V rámci protokolu pre toto farbenie bolo potrebné vybrať vhodné zriedenie farbiva Giemsa. Porovnanie prebiehalo s dvomi vybraťmi variantami od dvoch rôznych výrobcov (Sigma, ROTH). Pre čas inkubácie bol ako pilotný vybrať interval 40 minút. Následne len pre variantu zásobného roztoku 1:9 boli použité časy 30, 40 a 60 minút.

Ako prvé bolo testované zriedenie farbiva Giemsa 1:20 v PBS pre suspenziu HC, z ktorej bol pripravený natívny preparát aj fixovaný preparát. Ten bol pripravený dvoma spôsobmi (kvapka, rozter) – kvapka bol vytvorená nanosením 20 μ l suspenzie HC na podložné sklo a bolo takto ponechané pre uschnutie, naopak pri roztere bolo nanosených 20 μ l na podložné sklo a pomocou druhého skla bola suspenzia rozťahnutá po celej ploche skla. Čas inkubácie bol v intervale 40 minút. Pri mikroskopickom pozorovaní natívneho preparátu v BF (Obr. 14) bolo viditeľné, že HC neboli zafarbené, čo mohlo byť spôsobené vysokým zriedením zásobného roztoku farbiva prípadne časovým intervalom inkubácie a neboli teda vo svetelnom poli viditeľné. Pri pozorovaní fixovaných preparátov boli HC plne ofarbené, avšak problém u oboch variant boli viditeľné praskliny, ktoré rušili pozorovanie (Obr. 14).

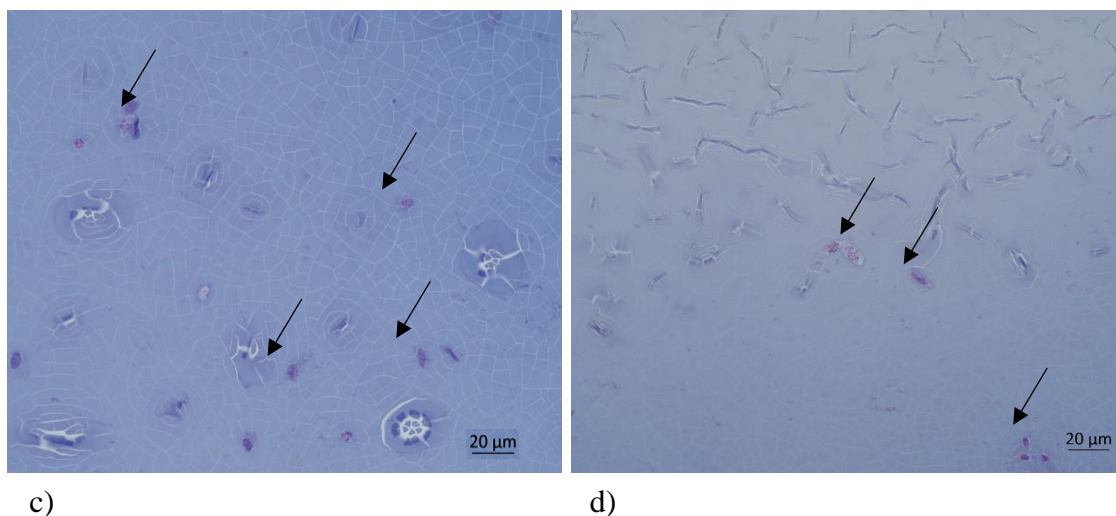


Obrázok 14: Purifikovaná suspenzia HC (odber HL do PBS s PTU v pomere 1:5) po farbení Giemsa (zriedenie farbiva 1:20) – fixovaný preparát, rozter (BF, 1000x).

Následne bola skúšaná druhá varianta zriedenia farbiva Giemsa 1:9 v PBS, taktiež pre purifikovanú suspenziu HC, z ktorej bol opäť pripravený natívny aj obe verzie fixovaného preparátu. Ako je možné vidieť ani pri menšom zriedení zásobného roztoku farbiva neboli v natívnom preparáte pozorované ofarbené HC vo svetelnom poli (Obr. 15, a). Z tohto dôvodu bol využitý DIC – pre kontrolu prítomnosti hemocytov s nevyužitím farbiacej techniky, kde boli zaznamenané HC. DIC využíva index lomu štruktúr pre ich zviditeľnenie a vytvorí priehlbiny, pri nízkom indexe lomu a vyvýšeniny pri vysokom indexe lomu, napr. mitochondrie a jadro, je to zobrazenie pre natívne preparáty bez ofarbenia (Obr. 15, b). Giemsa je histologické farbivo, ktoré sa bežne používa v histochemii na fixované preparáty (Kuchel et al., 2010; Bruno et al., 2022), týmto sme si overili, že na natívne preparáty toto farbenie nie je vhodné. Taktiež boli pozorované fixované preparáty v dvoch variantách, kde boli HC plne ofarbené s ostrým ohraničením bunkovej membrány a s dobre viditeľnými jadrami. Hlavný rozdiel v týchto dvoch variantách bol v nahustení HC – v kvapke bol počet HC (Obr. 15, c) v zornom poli mikroskopu oveľa vyšší ako pri variante rozter, kde boli bunky rozptýlené po celej ploche podložného skla (Obr. 15, c, d). Aj keď z tohto dôvodu bola varianta kvapka lepšou voľbou, pokračovali sme v ďalšej práci optimalizačných krokov s oboma variantami.



Obrázok 15: Purifikovaná suspenzia HC (odber HL do PBS s PTU v pomere 1:5) po farbení Giemsa (zriedenie farbiva 1:9) – a: natívny preparát (BF, 1000x); b: natívny preparát (DIC, 1000x).

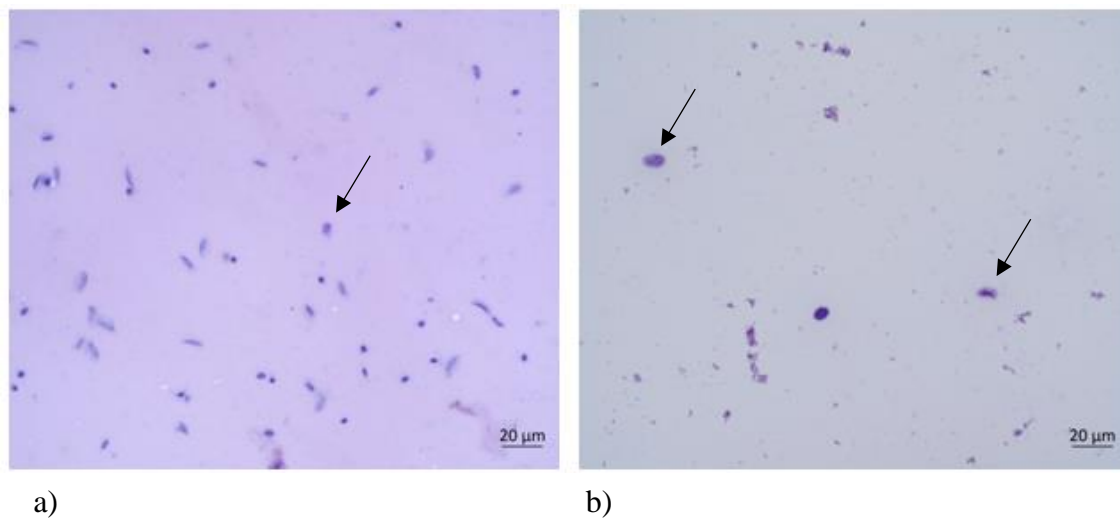


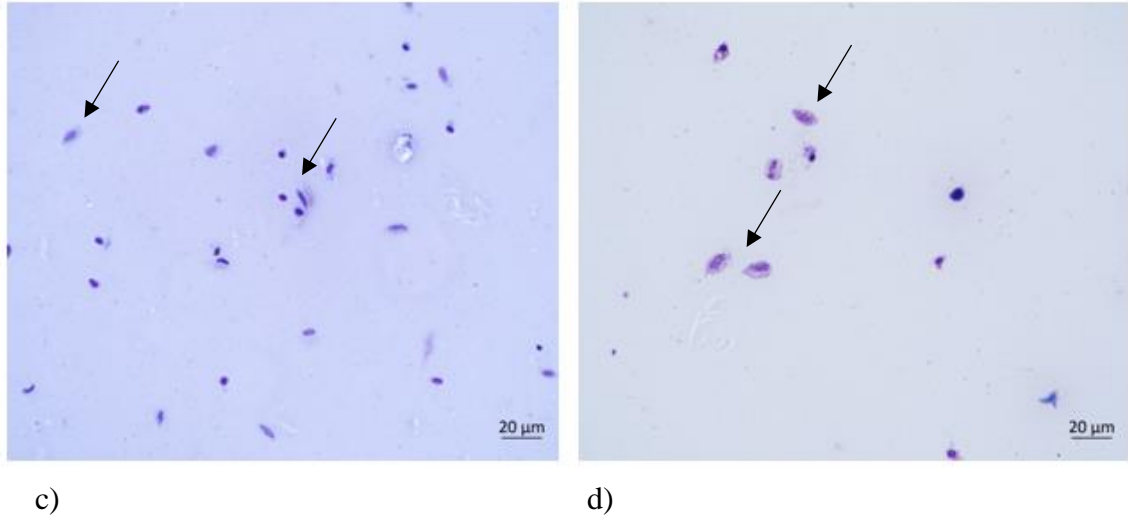
Obrázok 16: Purifikovaná suspenzia HC (odber HL do PBS s PTU v pomere 1:5) po farbení Giemsa (zriedenie farbiva 1:9) c: fixovaný preparát – kvapka (BF, 1000x), d: fixovaný preparát – rozter (BF, 1000x).

Pre ďalší postup v rámci farbenia HC technikou Giemsa bolo vybrané zriedenie farbiva Giemsa v pomere 1:9. Avšak aj pri tomto zriedení rovnako ako pri zriedení farbiva v pomere 1:20 boli pozorované rušivé praskliny. Toto vznikalo pravdepodobne v dôsledku prečisťovania HL na vrstve Percollu, ktorý pravdepodobne zostal zostatkovou časťou v HC po purifikácii HC a preto nebol v ďalšej práci pre farbenie hemocytov s využitím Giemsa farbiva používaný s purifikovanou suspenziou HC na vrstve Percollu.

Ďalším aspektom, ktorý by mohol ovplyvniť kvalitu pripravovaných fixovaných preparátov vzhľadom ku kvalite HC a pozadia roztoku HL v PBS je spôsob ich prípravy, teda

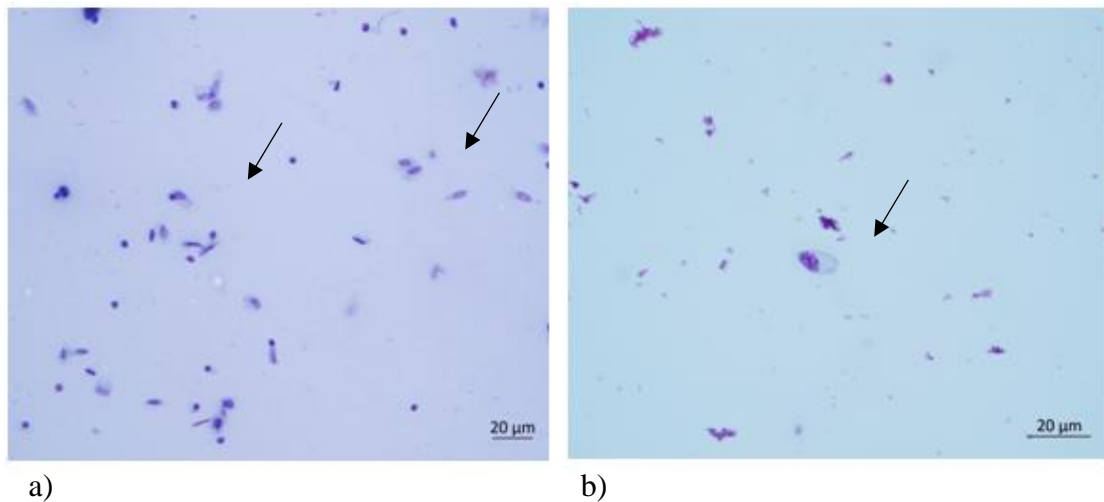
fixácia preparátov plameňom či metanolom. Pre tento pokus bolo použité zriedenie HL v PBS s 1% PTU v pomere 1:1 a obe varianty fixovaného preparátu (kvapka, rozter) (Obr. 17). Pri mikroskopickom pozorovaní bolo vizuálne lepšie pozadie hemolymfy s HC po fixácii metanolom (Obr. 17, a, b), pričom pri fixácii plameňom sa vytvorilo veľa rušivých vzduchových bublín (Obr. 17, c d). Pri porovnaní kvapkovej metódy a rozteru boli z vizuálneho hľadiska obe veľmi dobrej kvality, vzhľadom k intaktnosti HC a čistote pozadia roztoku HL v PBS. Jediný rozdiel bol v nahustení HC a prítomnosti balastných látok, ktorý tu bol očakávaný vzhľadom na to, že pre toto farbenie nie je možné použiť preparát pripravený z purifikovanej suspenzie HC . Pri kvapkovej metóde boli HC viac nahustené v porovnaní s rozterom, kde boli bunky rozptýlené po celej ploche podložného skla. Pri tomto experimente neboli na pozadí pozorované, už skôr spomínané, rušivé praskliny, čo potvrdilo, že dôvodom prasklín v predchádzajúcom experimente bol roztok Percollu, použitý pre prečistenie HL v PBS. Pre nasledujúcu prácu bolo ako najvhodnejšie vybrané fixovanie metanolom, pričom je možné použiť obe varianty prípravy fixovaného preparátu, teda kvapku a rozter (Obr. 17, c, d).





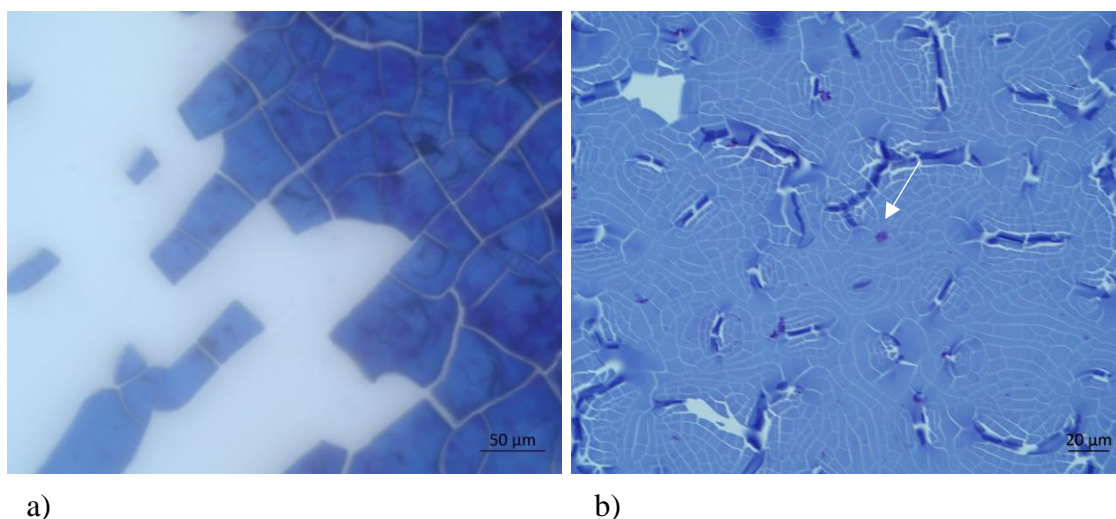
Obr 17: HC prítomné v HL (odber do PBS s PTU v pomere 1:5) po farbení Giemsa (zriedenie farbiva 1:9) - fixácia - plameň, MeOH – zriedenie HL (1:5) v PBS s PTU – a: kvapka, plameň; b: rozter, plameň; c: kvapka, MeOH, d: rozter, MeOH, neprečistená HL (BF, 1000x).

Ďalším kritériom, ktoré bolo nutné optimalizovať bola doba pôsobenia farbiva Giemsa. Vybraté boli tri časové intervaly, ktoré boli použité pre obe varianty fixovaného preparátu. Po vyhodnotení v BF boli po vizuálnej a kvalitatívnej stránke najlepšie dva – kvapka 30 minút a rozter 60 minút (Obr. 18). Na základe týchto výsledkov boli pre farbenie HC technikou Giemsa finálne vybrané kvapka pri 30 minútach (Obr. 18, a) a rozter pri 60 minútach (Obr. 13, b).



Obr 18: HC prítomné v HL (odber do PBS s PTU v pomere 1:5) po farbení Giemsa (zriedenie farbiva 1:9) - časové intervaly - a: kvapka, 30 minút (BF, 1000x); b: rozter, 60 minút – neprečistená HL (BF, 1000x).

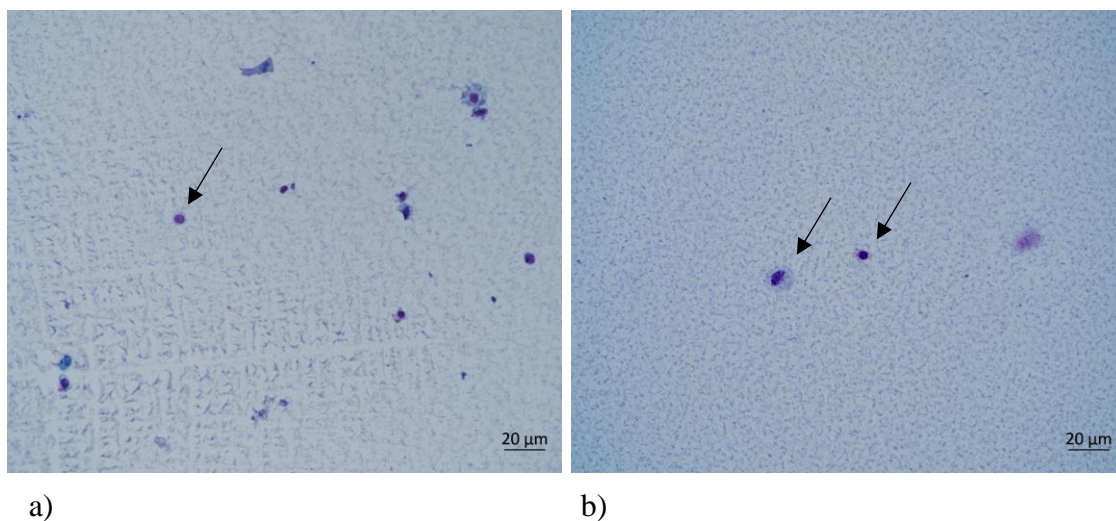
Po finálnej optimalizácii protokolu pre farbenie HC Giemsou bol ešte raz tento postup zopakovaný pre prečistenú suspenziu HC, od ktorej sa v začiatkoch optimalizácie tejto farbiacej techniky na včelie HC vzhľadom k prasklinám na podložnom sklíčku upustilo. Farbivo Giemsa bolo použité v zriedení 1:9 v dH₂O. Pokus bol urobený pre dva najlepšie vizuálne vyzerajúce fixované preparáty – kvapka 30 minút a rozter 60 minút. Po uplynutí doby inkubácie boli preparáty pozorované v BF, kde boli opäť viditeľné praskliny v prípade rozteru a šupinky pri kvapkovej metóde (Obr. 19).



Obr 19: Purifikovaná suspenzia HC (odber HL do PBS s PTU v pomere 1:5) po farbení Giemsa (zriedenie farbiva 1:9) - nekompatibilita s roztokom Percollu (60 %) – a: fixovaný preparát - kvapka (BF, 400x), b: fixovaný preparát – rozter (BF, 1000x).

Posledným optimalizačným krokom pri práci s farbivom Giemsa pre farbenie purifikovanej suspenzie HC na vrstve Percollu bol ešte pokus o prečistenie suspenzie HC od roztoku Percollu, ktorý môže byť zbytkovo v purifikovanej frakcii HC obsiahnutý. Purifikačný proces HC bol urobený za podmienok zriedenia HL v PBS s 1% PTU v pomere 1:5 a 60% roztoku Percollu. Po prečistení od roztoku Percollu, pomocou dvojitej centrifugácie (500x g, 1 min.), boli fixované preparáty opäť pozorované v BF. Opäť boli použité dve vizuálne najlepšie varianty fixovaných preparátov (kvapka 30 minút a rozter 60 minút). Pozadie suspenzie HC na podložnom skle týchto preparátov už neobsahovalo praskliny v prípade rozteru ani šupiny v prípade kvapky, avšak stále bol pozorovaný rušivý šum, ktorý znemožňoval dobrú viditeľnosť HC vo svetelnom poli (Obr. 20). Z tohto pozorovania vyplynul záver, že ani po pokuse o prečistenie vzorky od roztoku Percollu, nebolo pozorovanie ideálne. Z týchto poznatkov bol vyvodený záver, že roztok Percollu nie

je kompatibilný a nie je ho možné použiť pre purifikáciu HC s následným farbením fixovaných preparátov pomocou farbiva Giemsa.



Obrázok 20: Purifikovaná suspenzia HC (odber HL do PBS s PTU v pomere 1:5) po farbení Giemsa (zriedenie farbiva 1:9) - nekompatibilita s roztokom Percollu (60 %) – a: fixovaný preparát, kvapka, b: fixovaný preparát, rozter (BF, 1000x).

4.2.2 Neutrálna červen

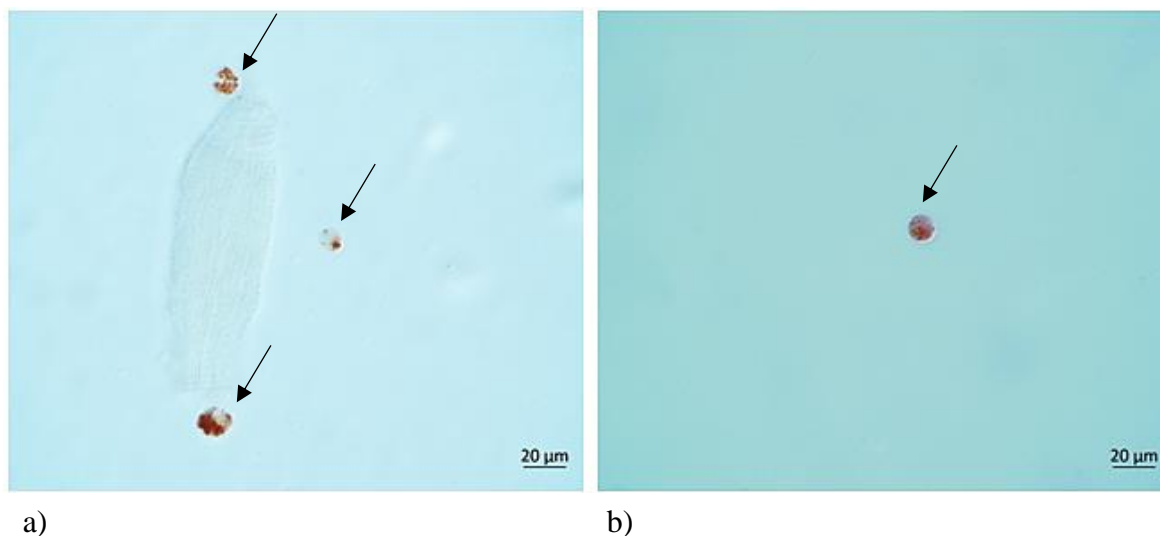
Neutrálna červen (NČ) je farbivo používané pre farbenie živých buniek, taktiež je možné ho použiť ako pH indikátor (zmena farby z červenej po žltú pri zvyšovaní zásaditosti roztoku). Pri farbení živých buniek sa farbivo viaže na lyzozómy a farbí ich na červeno (Ates et al., 2017). Rovnako sa dá využiť pre rozlíšenie buniek medzi živými a mŕtvymi, pričom mŕtve bunky zostávajú neofarbené (Gomez-Gutierrez et al., 2021).

Pre farbenie pomocou neutrálnej červene bol pripravený natívny preparát HL či suspenzie HC v dvoch variantách, a to bez premývania po farbení NČ a s premytím a taktiež boli pripravené obe varianty fixovaného preparátu (kvapka, rozter).

Ako prvý bol pripravený natívny preparát bez prečistenia HL. Pre pilotné pozorovanie bolo použité zriedenie HL v PBS s PTU v pomere 1:1. Pri mikroskopickom pozorovaní v BF bol viditeľný veľký obsah balastu v pozorovanom preparáte – vzhľadom k typu vzorky, teda neprečistenej HL (Obr. 21, a).

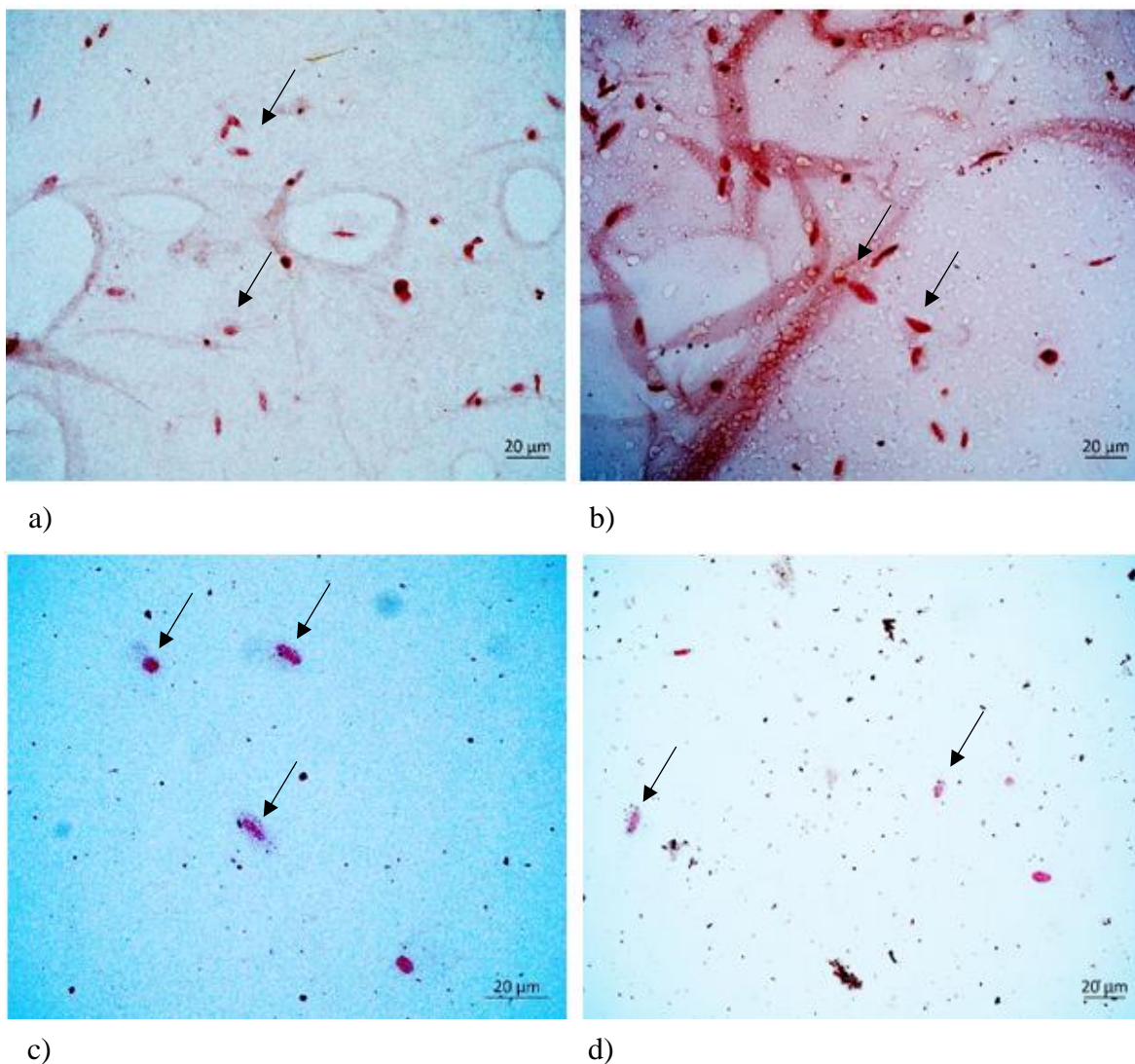
Zvyšok HL v PBS s PTU (1:1) po jej farbení bol použitý pre premytie od nadbytku farbiva pomocou viacnásobnej centrifugácie (500x g, 1 min., 25°C). Prebehlo mikroskopické pozorovanie v BF, pri ktorom bolo vidieť plne ofarbené HC s viditeľnými granulami

vo vnútri a ostro ohraničenou membránou. V priebehu premývania sa podarilo rovnako odstrániť časť balastných zložiek (Obr. 21, b).



Obrázok 21: HC v HL po farbení NČ (odber HL do PBS s PTU v pomere 1:1) - natívny preparát – a: bez prečistenia, b: po prečistení (BF, 1000x).

Následne bol ešte urobený fixovaný preparát v dvoch variantách (kvapka, rozter) a aj pre tieto preparáty bolo použité zriedenie HL v PBS s 1% PTU v pomere 1:1 bez prečistenia na Percolle. Boli zvolené dve doby schnutia fixovanej HL v PBS na podložnom skle pred samotným farbením, a to hneď po uschnutí (Obr. 21, a, c) a 10 minút po uschnutí metanolu (Obr. 21, b, d). Následne po ubehnutí časového intervalu boli preparáty prevrstvené farbivom NČ a inkubované v tme pri 25°C po dobu 5 minút. Po uplynutí času inkubácie boli preparáty opatrne opláchnuté dH₂O. Po farbení fixovaného preparátu dochádzalo k značnému farbeniu pozadia preparátu a z tohto dôvodu nie je táto metodika vhodná. Navyše aby bola NČ udržaná v lyzozómoch buniek bude potreba aby na membráne bol udržaný pH gradient, ktorý farbivo nevypustí z bunky von, teda aby boli bunky živé a nie usmrtené v rámci prípravy fixovaného preparátu (Gomez-Gutierrez et al., 2021). Z tohto bol vyvodený záver, že NČ nie je kompatibilná s fixovanými preparátmi a je preferované jej využitie pre natívne preparáty.

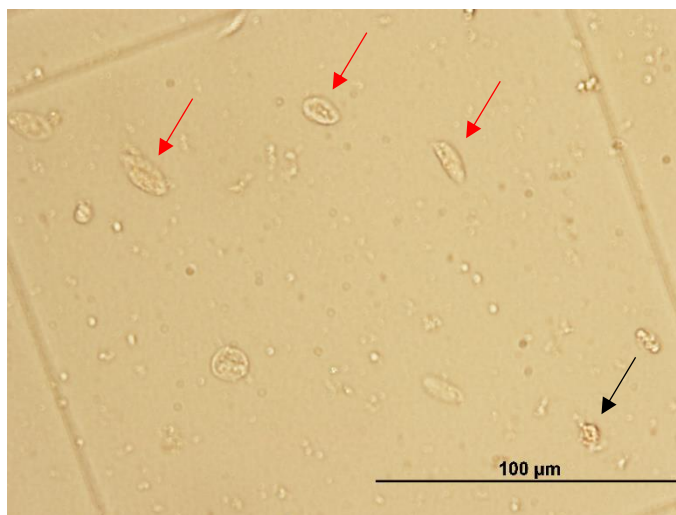


Obrázok 22: HC v HL po farbení NČ (odber HL do PBS s PTU v pomere 1:1) – fixovaný preparát, rozter – a: kvapka, hneď po uschnutí; b: kvapka, 10 minút po uschnutí; c: rozter, hneď po uschnutí; d: rozter, 10 minút po uschnutí (BF, 1000x).

Jedným z dôvodov prečo bolo testované farbenie hemocytov NČ bolo uľahčenie vizualizácie hemocytov pre stanovenie ich počtu pomocou Bürkerovej komôrky. Porovnanie prebehlo medzi zriedením HL v PBS s 1% PTU v pomere 1:1 (vzorka 1) (Obr. 23) a purifikovanou suspenziou HC (vzorka 2) (Obr. 24) o celkovom objeme 200 μ l. Mikroskopické pozorovanie natívných preparátov oboch vzoriek na Bürkerovej komôrke prebehlo v BF.

Vo vzorke číslo 1 bol pri mikroskopickom pozorovaní zaznamenaný balastný obsah, čo bolo očakávané vzhľadom na neprečistenie HL. Z pozorovania boli rozoznatelné ofarbené živé hemocyty aj neofarbené mŕtve hemocyty, aj keď mikroskop výsledky veľmi skresľoval.

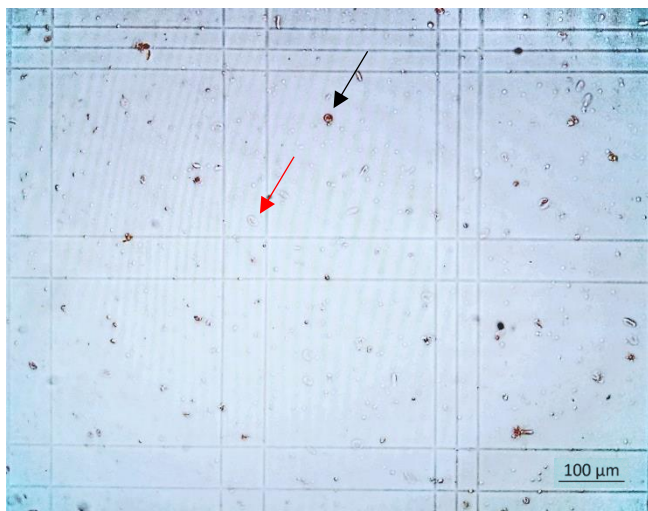
Podľa hodnôt (Tab. 1) bol celkový počet buniek 65, z čoho bolo 17 živých a 48 mŕtvych HC. Obsah buniek v 1 mm^3 (x) bol 1625. Percentuálny podiel živých buniek bol 26,2 %, čo nie je ani jedna tretina celkového počtu buniek.



Obrázok 23: HC v HL po farbení NČ (odber HL do PBS s PTU v pomere 1:1) - Bürkerova komôrka (BF, 200x) – čierna šípka: živé bunky, červená šípka: mŕtve bunky.

Vo vzorke číslo 2 bol zaznamenaný balastný obsah len ojedinele, vzhľadom na to, že sa pracovalo s purifikovanou suspenziou HC. Pri mikroskopickom pozorovaní boli dobre rozoznateľné živé (ofarbené) aj mŕtve (neofarbené) HC. Podľa výsledkov (Tab. 1) bol celkový počet buniek 98, z čoho bolo 68 živých a 30 mŕtvych HC. Obsah buniek v 1 mm^3 (x) bol 2450, čo je viac ako dvojnásobok HC vo vzorke číslo 1, ktorá prečistená nebola.

Toto porovnanie naznačuje, že pri centrifugácii na vrstve Percollu sú bunky celkovo (aj živé aj mŕtve) zakoncentrované do frakcie prstenca HC. Percentuálny podiel živých buniek vo vzorke bol 69,4 %, ktorý je taktiež viac ako dvojnásobne vyšší než vo vzorke 1. Tento výsledok taktiež naznačuje, že purifikácia s roztokom Percollu napomáha zakoncentrovaniu hlavne živých HC do frakcie prstenca HC.



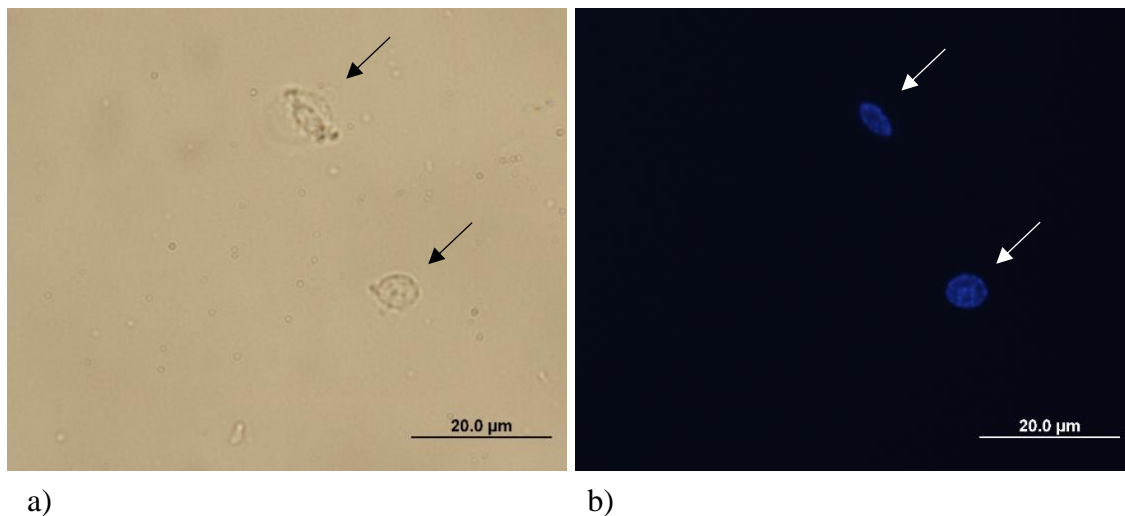
Obrázok 24: Purifikovaná suspenzia HC (odber HL do PBS s PTU v pomere 1:5) po farbení NČ – Bürkerova komôrka (BF, 100x) – čierna šípka: živé bunky; červená šípka: mŕtve bunky.

Tabuľka 1: Hodnoty celkového počtu buniek, počtu živých HC, počtu mŕtvych HC, x a percentuálneho podielu živých buniek pre HL v PBS s PTU v pomere 1:1 (vzorka 1) a pre purifikovanú suspenziu HC (vzorka 2).

Farbenie	Číslo vzorky	Percoll	Celkový počet buniek	Počet živých buniek	Počet mŕtvych buniek	x [1 mm ³]	% živých buniek
NČ	1	nie	65	17	48	1625	26,2
	2	áno	98	68	30	2450	69,4

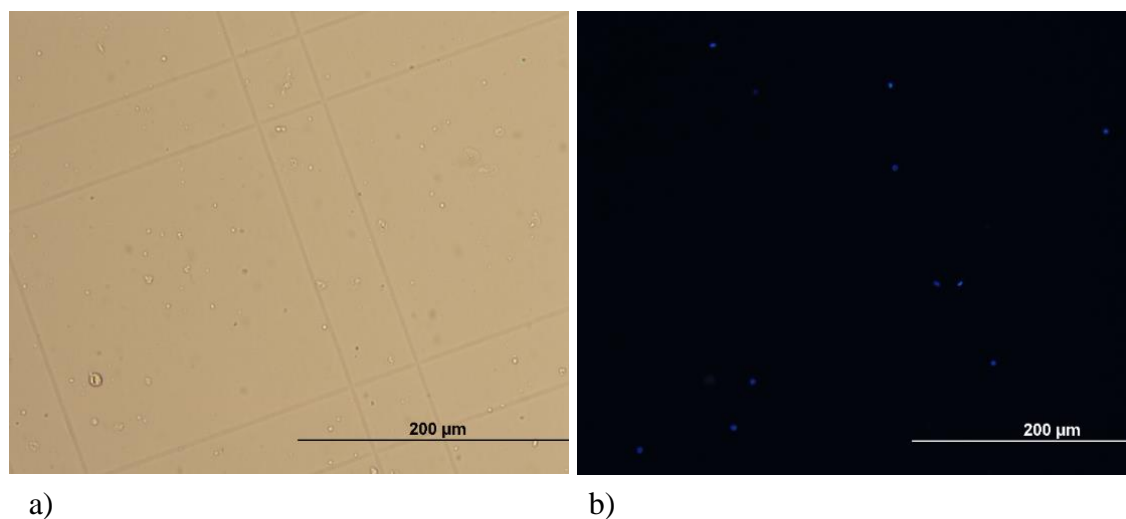
4.2.3 Farbenie jadier HC fluorescenčnou sondou DAPI

Pre jednoduchšiu identifikáciu buniek bol zvolený ďalší postup ich vizualizácie, tentokrát farbením jadier pomocou fluorescenčnej sondy 4',6-diamidino-2-fenylindol (DAPI), ktorá vytvára modré sfarbenie pri väzbe na adenín-thymín regióny v DNA (Wallberg et al., 2016). Bola použitá purifikovaná suspenzia HC, ktorá bola najskôr inkubovaná s NČ v tme (5 min., 25°C). Samotné farbenie DAPI prebehlo bez inkubácie a v pomere 1:1 (HL:DAPI) v mikroskúmvke. Pre zobrazenie HC bolo využité pozorovanie v BF a taktiež pomocou fluorescenčnej mikroskopie na hranole WD pri expozícii 1/20 pre natívny preparát (Obr. 25) aj pre preparát na Bürkerovej komôrke za účelom ľahšieho určenia počtu hemocytov – vzhľadom na nízky kontrast hemocytov za podmienok ich pozorovania v BF (Obr. 26).



Obr 25: Purifikovaná suspenzia HC po farbení DAPI (odber HL do PBS s PTU v pomere 1:5) – natívny preparát – a: BF, b: DAPI (BF, DAPI, 600x, exp. 1/20).

Toto farbenie bolo teda rovnako otestované pre potencionálne použitie pre stanovenie celkového počtu buniek vo vzorke s využitím Bürkerovej komôrky (Obr. 26).



Obr 26: Purifikovaná suspenzia HC po farbení DAPI (odber HL do PBS s PTU v pomere 1:5) – natívny preparát – a: BF, b: DAPI (BF, DAPI, 200x, exp. 1/20).

4.3 Stanovenie životnosti hemocytov

Pre mikroskopické stanovenie životnosti HC boli vybrané dve fluorescenčné sondy (FDA, PI) a jedno farbivo (TB).

Propidium jodid (PI) je sonda a Trypanová modrá (TB) farbivo, ktoré farbja mŕtve bunky s porušenou bunkovou membránou. PI preniká do buniek a viaže sa na DNA v jadre bunky,

kde vytvára červenú fluorescenciu (Yokohama et al., 1997). TB je naopak zo živých buniek aktívne transportovaná cez bunkovú membránu, z tohto dôvodu po zmiešaní bunkovej suspenzie s TB zostávajú živé bunky svetlé, pokým mŕtve sa ofarbia na modro. (Crowley et al., 2016).

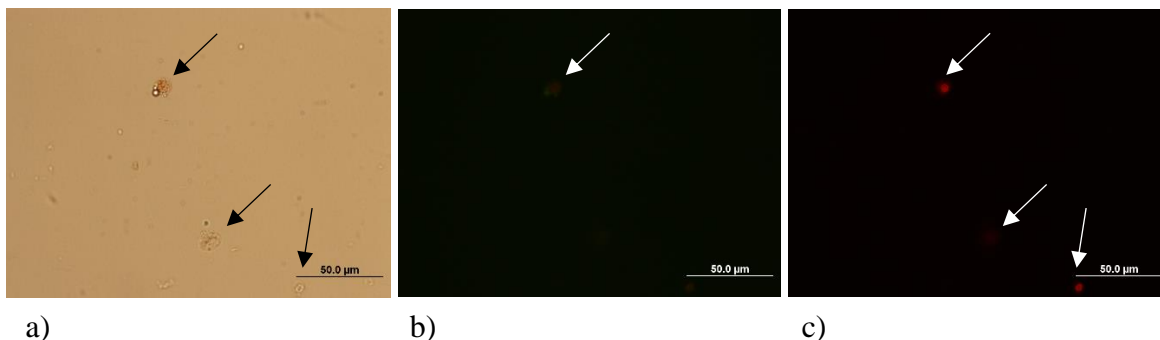
Fluoresceíndiacetát (FDA) ako jediné z nich farbí živé bunky s neporušenou membránou a aktívnym metabolizmom. Často sa používa v „teste dvojitého farbenia“, kde sa používa FDA spolu s PI pre rozlíšenie živých a mŕtvych buniek v rovnakej suspenzii buniek (Shi et al., 1995).

Mikroskopickým pozorovaním bolo urobené porovnanie životnosti HC v BF (pre TB) a fluorescenčnou mikroskopiou (pre FDA a PI).

4.3.2 Stanovenie životnosti HC pomocou dvojitého farbenia FDA/PI

Test dvojitého „farbenia“ (FDA/PI) pre stanovenie životnosti hemocytov bol taktiež použitý pre purifikovanú suspenziu hemocytov, ktorá bola najskôr inkubovaná s NČ v tme (25°C, 5 minút) pre zviditeľnenie prstenca frakcie HC. Pre prípravu preparátov boli urobené dve varianty, pre prvú bolo na podložné sklo nanosených 50 µl FDA/PI a pridaných 20 µl suspenzie HC, pre druhú bolo na podložné sklo nanosených 20 µl suspenzie HC a pridaných bolo 5 µl FDA/PI. Inkubácia prebehla v tme po dobu minimálne 3 minúty. Následne bola suspenzia prikrytá krycím sklíčkom a pozorovaná v BF a fluorescenčným mikroskopom (Obr. 25), najskôr pre FDA (hranol B – exp. 1/130), ktoré sa skôr vysvecuje a následne pre PI (hranol G – exp. 1/50).

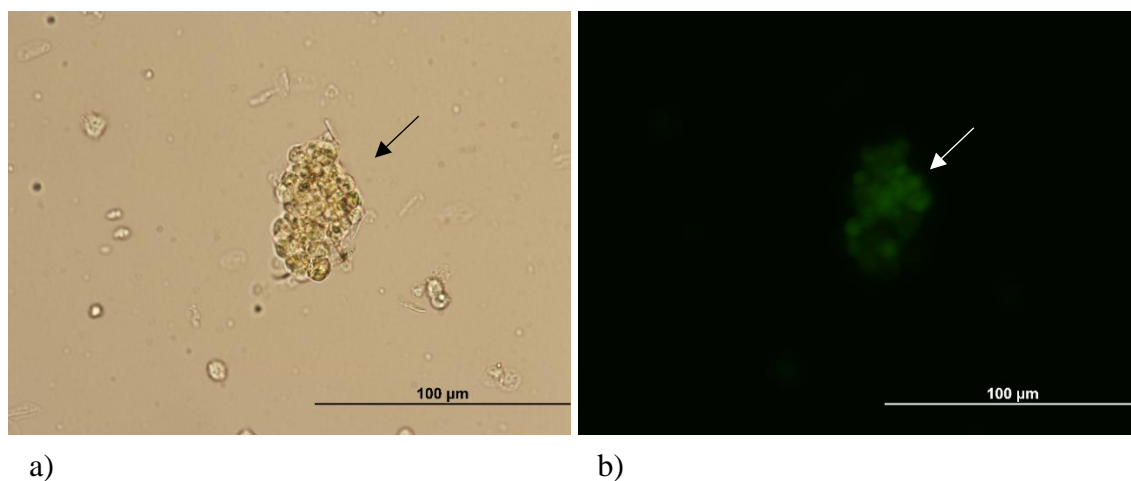
Ako je možné vidieť na obrázkoch takmer všetky HC boli mŕtve. To by mohlo súvisieť s bunkovou membránou hemocytov, v štúdií z roku 2003, boli robené testy s PI a ukázalo sa, že oenocytoidy aj keď nemali porušenú membránu pohltili PI a svietili na červeno z čoho vyvodili záver, že oenocytoidy majú veľmi krehkú membránu, ktorou je PI schopné prestúpiť (Ling et al., 2003). V rámci optimalizačných krokov preto bola ďalej vybratá len varianta jednodruhového farbenia, konkrétne so sondou pre živé bunky, teda FDA.



Obr 27: Purifikovaná suspenzia HC po farbení FDA/PI (odber HL do PBS s PTU v pomere 1:5) - natívny preparát - a: BF, farbenie NČ, b: sonda FDA, c: sonda PI (BF, hranol B, hranol G, 600x).

4.3.3 Stanovenie životnosti HC pomocou FDA

Použitie fluorescenčnej sondy FDA bolo robené pre čerstvo odobratú HL v PBS s 1% PTU v pomere 1:5 bez prečistenia. Po inkubácii bol preparát pozorovaný v BF a fluorescenčnou mikroskopiou (Obr. 26) (hranol B – exp. 1/130). Pri tomto farbení bolo vidieť takmer len živé HC čo nám potvrdilo teóriu, že PI zrejme prestupuje rovnako cez membrány živých hemocytov a interferuje tak s daným stanovením.



Obr 28: Purifikovaná suspenzia HC po farbení FDA (odber HL do PBS s PTU v pomere 1:5) - natívny preparát - a: BF, b: sonda FDA (BF, hranol B, 400x, exp. 1/130).

4.3.4 Stanovenie životnosti HC pomocou Trypanovej modrej

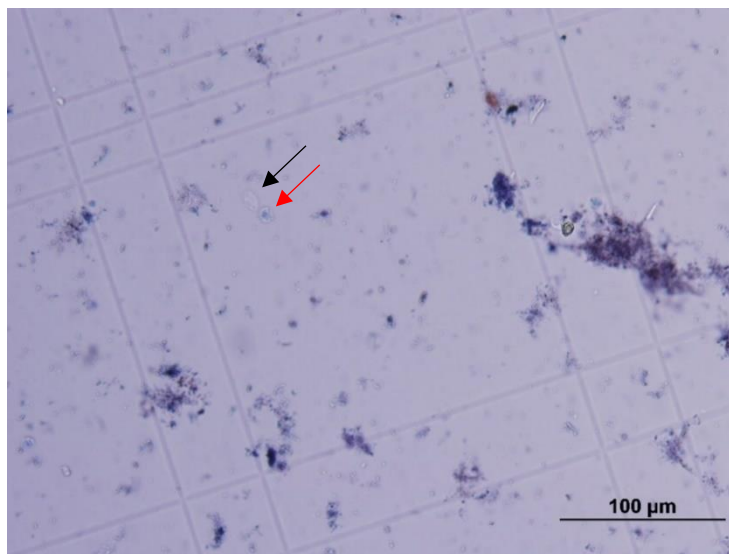
Z purifikovanej suspenzie HC bolo najskôr odobratých 95 µl vrchnej frakcie supernatantu (HC-95) a následne 100 µl frakcie prstenca HC (HC-100). Cieľom experimentu bolo zistiť, aké percento živých HC sa po centrifugácii nachádza vo frakcii HC-100, prípadne koľko živých HC sa stráca vo frakcii HC-95, ktorý normálne nie je využívaný pre pozorovanie.

Farbenie pomocou TB bolo urobené v triplikáte pre HL v PBS s PTU v pomere 1:5 bez prečistenia a rovnako aj pre HL v PBS s PTU v pomere 1:5 s prečistením na 60% Percolle za účelom porovnanie úspešnosti zavedeného protokolu pre purifikáciu hemocytov zo všelej hemolymfy.

Ako prvé bol pripravený natívny preparát pre HL v PBS s PTU v pomere 1:5. Bez inkubácie bolo do priehlbiny v strede Bürkerovej komôrky nanosených 20 μ l vzorky a prikrytých pomocou krycieho sklíčka. Pozorovanie a následné počítanie živých a mŕtvych HC vo vzorke prebehlo v BF (Obr. 29).

Pri mikroskopickom pozorovaní farbených HC na Bürkerovej komôrke v BF bol z vizuálneho hľadiska prítomný balastný obsah, ktorý bol očakávaný vzhľadom na neprečistenie HL (Obr. 29). Farbenie TB bolo robené v triplikáte, teda boli pripravené tri vzorky.

Pre vzorky 1, 2 a 3 (vz. 1-3, neprečistená HL) (Tab. 2) bol spočítaný celkový počet hemocytov, počet živých a mŕtvych buniek, ďalej obsah hemocytov v 1 mm^3 čo odpovedá 1 μ l vzorky (x) podľa vzorca a následne priemerný počet živých buniek a ich percentuálny obsah z celkového priemerného počtu hemocytov. Hodnota obsahu HC v 1 mm^3 (Tab. 2), bola pre vzorku 1112 buniek, pre vzorku 2 bola 925 buniek a pre vzorku 3 bola 825 buniek, priemerný počet HC v 1 mm^3 bol 954 buniek. Podľa ďalších číselných výsledkov je možné vidieť, že hodnoty priemerného počtu živých HC (27) v porovnaní s hodnotami priemeru celkového počtu HC (65), ako aj ich priemerný percentuálny obsah (41,8 %) sú menšie ako polovica. Je možné, že nebolo so vzorkami správne zaobchádzané a z toho dôvodu sme dostali takýto výsledok.



Obr 29: HC v HL po farbení TB (odber HL do PBS s PTU v pomere 1:5) - Bürkerova komôrka - natívny preparát – čierna šípka, živý HC; červená šípka, mŕtvy HC; neprečistená HL (BF, 200x).

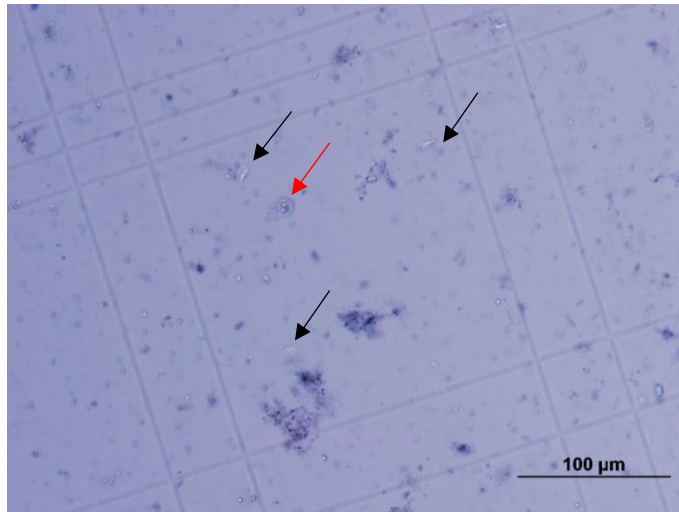
Tabuľka 2: Hodnoty celkového počtu živých buniek, celkového počtu mŕtvych buniek, priemerného celkového počtu HC, \bar{x} , priemerného počtu živých HC a percentuálny podiel živých HC vo vzorkách pre HC v HL po farbení TB (odber HL v PBS s PTU v pomere 1:5), neprečistená HL.

Farbivo	Vzorka	Percoll	Celá vzorka				Priemerný počet živých HC	% živých HC
			Celkový počet živých buniek	Celkový počet mŕtvych buniek	Priemer celkového počtu HC	\bar{x} [1 mm ³]		
TB	1		36	53		1112		
	2	nie	31	43	65	925	27	
	3		15	18		825		

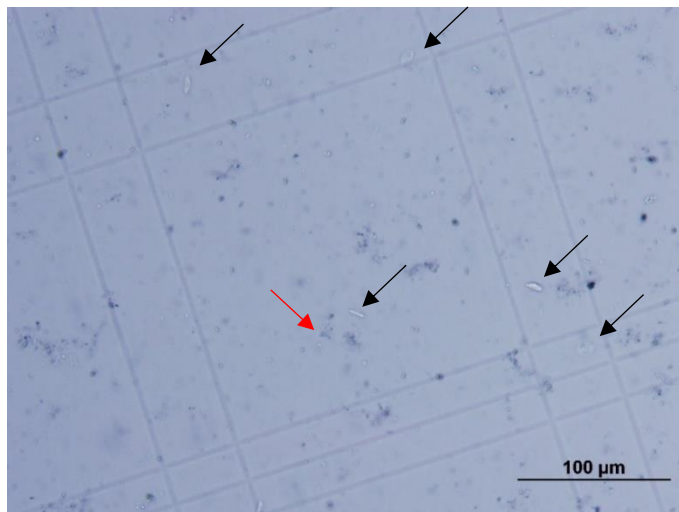
Následne bol pripravený natívny preparát z purifikovanej suspenzie HC. Po purifikácii na vrstve Percollu bolo zo vzorky odobratých 95 µl suspenzie HC (HC-95) a následne 100 µl frakcie prstenca HC (HC-100). Rovnako bez inkubácie bolo do priehlbiny na Bürkerovej komôrke nanesených 20 µl vzorky a prikrytých pomocou krycieho sklíčka. Pozorovanie a následné počítanie živých a mŕtvych HC vo vzorke prebehlo v BF. Farbenie TB bolo pre purifikovanú suspenziu HC rovnako urobené v triplikáte, teda boli pripravené tri vzorky (4, 5, 6).

Mikroskopickým pozorovaním v BF na Bürkerovej komôrke bol vo vzorke viditeľný balastný obsah, čo mohlo byť spôsobené pravdepodobne odberom suspenzie HC z vrchnej frakcie supernatantu kde sa balast mohol zachytiť. Podľa výsledkov (Tab.2), pri porovnaní priemerného percentuálneho obsahu živých HC u vzoriek bez prečistenia na vrstve Percollu (vz. 1, 2, 3), 41,8 %, a u vzoriek prečistenej suspenzie HC-100 (Tab. 3) (vz. 4b, 5b, 6b), 89,6 %, je pravdepodobné, že HC sú nejakým spôsobom vo vzorkách 1, 2 a 3 poškodzované - z dôvodu nesprávnej manipulácie so vzorkou a z toho dôvodu sa v nich nachádza menší podiel živých HC. Vo vzorkách s neprečistenou HL bola očakávaná najväčšia životnosť HC.

Mikroskopické pozorovanie najskôr prebehlo pre frakciu HC-95 (Obr. 30) a následne HC-100 (Obr. 29) v BF. Pri porovnaní výsledkov (Tab. 3) hlavne celkového priemerného počtu HC, pre HC-95 je 57 buniek, pre HC-100 bol 32 buniek. Ďalej porovnanie priemerného percentuálneho obsahu HC, pre HC-95 bol 51,5 %, pre HC-100 bol 89,6 %. Z číselných hodnôt je zreteľné, že vyšší podiel živých HC obsahuje frakcia HC-100. Je teda pravdepodobné, že vplyvom centrifugácie na vrstve Percollu bola väčšina živých HC zakoncentrovaná do HC-100, frakcie prstenca HC. Navyše pri porovnaní percentuálneho podielu živých HC vo vzorkách bez prečistenia, 41,8 % (Tab. 2) a s prečistením v prstenci HC-100, 89,6 % (Tab. 3) je zreteľné, že vplyvom purifikácie na vrstve Percollu bola väčšina živých HC zakoncentrovaná vo vzorkách 4, 5, 6 a to konkrétne vo frakcii HC-100 (Tab.3).



Obr 30: Purifikovaná suspenzia HC (HC-95) po farbení TB (odber HL do PBS s PTU v pomere 1:5) - Bürkerova komôrka - natívny preparát – čierna šípka: živé bunky; červená šípka - mŕtve bunky (BF, 200x).



Obr 31: Purifikovaná suspenzia HC (HC-100) po farbení TB (odber HL do PBS s PTU v pomere 1:5) - Bürkerova komôrka - natívny preparát – čierna šípka: živé bunky; červená šípka: mŕtve bunky (BF, 200x).

Tabuľka 3: Hodnoty celkového počtu živých buniek, celkového počtu mŕtvych buniek, priemerného celkového počtu HC, x, priemerného počtu živých HC a percentuálny podiel živých HC vo vzorkách pre prečistenú suspenziu HC po farbení TB (odber HL v PBS s PTU v pomere 1:5), frakcia HC-95 a HC-100.

Farbivo	Číslo vzorky	Označenie	Celkový počet živých buniek	Celkový počet mŕtvych buniek	Celkový počet HC	Priemerný počet živých HC	% živých HC
TB	4a	HC-95	41	35	57	29	51,5
	5a		14	14			
	6a		33	28			
	4b	HC-100	26	1	32	28	89,6
	5b		23	5			
	6b		37	4			

5 ZÁVER

Bakalárska práca je primárne zameraná na problematiku hemocytov v rámci bunkovej imunity včely medonosnej, procesov, ktoré vykonávajú a možných techník ich pozorovania a štúdia. Na začiatku boli uvedené všeobecné poznatky o imunite hmyzu a následne konkrétne o bunkovej imunite so zameraním na včelu medonosnú. Potom nasledovala časť venovaná základným charakteristikám hemocytov, ich funkcií a významu pre hmyz a neskôr konkrétne ich funkcie pre *Apis mellifera*. Na konci teoretickej časti boli taktiež zahrnuté metódy ako je možné hemocyty študovať.

Experimentálna časť bola venovaná hlavne optimalizácii podmienok pre izoláciu a purifikáciu hemocytov z hemolymfy včiel vrátane optimalizácie protokolu pre ich mikroskopické pozorovanie vo svetelnom poli (vrátane farbiacich techník a stanovenie počtu hemocytov v hemolymfe/purifikovanej suspenzii hemocytov) a stanovenie ich životnosti pomocou farbiacich techník a fluorescenčných sond. Bolo dosiahnuté týchto dielčích výsledkov:

V rámci optimalizácie rutinného protokolu pre izoláciu a purifikáciu hemocytov:

1. Bolo urobené porovnanie čistoty a intaktnosti hemocytov v hemolymfe odobratej z mŕtveho a zo živého biologického materiálu (u lariev a dospelých robotníc)
 - Intaktnosť hemocytov aj čistota vzorky bola u živého materiálu podstatne lepšia.
2. Bola urobená optimalizácia izolácie hemolymfy do fosfátového pufru (PBS) s obsahom inhibítora fenoloxidasu fenylthiomočovinou (PTU) pre následnú purifikáciu na vrstve vysokohustotnej látky (Percoll)
 - Pri mikroskopickom pozorovaní bola vizuálna stránka aj intaktnosť hemocytov najlepšia pri zriedení hemolymfy v PBS a 1% PTU v pomere 1:5.
3. Pre purifikáciu hemocytov boli testované rôzne koncentrácie roztoku Percollu
 - Z mikroskopického pozorovania po purifikácii hemocytov vyplýva, že vzhľadom k získanému počtu hemocytov a ich intaktnosti bol najvhodnejší roztok Percollu o koncentrácii 60 %.

Taktiež bola urobená optimalizácia protokolu pre farbiace techniky:

4. Bola urobená optimalizácia protokolu pre farbiacu techniku Giemsa
 - Vzhľadom k nutnosti použiť fixované preparáty je nutné v dôsledku interferencie zostatkového Percollu z purifikácie hemocytov, používať pre túto techniku neprečistenú hemolymfu, osvedčilo sa jej zriedenie v pomere 1:5 v PBS s 1% PTU do celkového objemu 200 μ l;
 - Pre najlepšiu vizualizáciu hemocytov je vhodné použitie zriedenia zásobného roztoku farbiva Giemsa v dH₂O v pomere 1:9;
 - Farbenie Giemsa nie je vhodné používať pre natívne preparáty;
 - Ako verzie fixovaného preparátu je možné využiť nanosenie vzorky v podobe kvapky aj techniku rozteru;
 - Fixáciu preparátu pre následné farbenie Giemsa je vhodné robiť pomocou metanolu;
 - Doba inkubácie s farbivom je pre verziu fixovaného preparátu naneseného v podobe kvapky vhodná v dĺžke 30 minút a pre verziu rozter v časovom intervale 60 minút.
5. Bolo urobené mikroskopické pozorovanie hemocytov s využitím Neutrálnej červene pre zvýšenie ich kontrastu vo svetelnom poli (ide využiť aj pre rozlíšenie živých a mŕtvych buniek) a fluorescenčnej sondy DAPI pre výpočet celkového počtu hemocytov vo vzorke
 - Farbenie Neutrálnou červeňou nie je vhodné používať pre fixované preparáty;
 - Pre túto techniku farbenia je vhodné hemolymfu purifikovať na vrstve Percollu;
 - Pre dosiahnutie lepšieho výsledku je vhodné po farbení Neutrálnou červeňou hemolymfu/suspenziu hemocytov premyť od nadbytku farbiva (pomocou klasickej centrifugácie).
6. S využitím farbiacich techník a fluorescenčných sond bolo urobené stanovenie životnosti hemocytov
 - Použitie „testu dvojitého farbenia“ (FDA/PI) nie je pre hemocyty vhodné, pretože morfológické charakteristiky niektorých typov hemocytov skresľujú výsledky (priepustnosť PI cez bunkovú membránu aj živých buniek);

- Pre prácu s fluorescenčnou sondou FDA za účelom stanovenia životnosti hemocytov je vhodné pracovať so suspenziou hemocytov bez využitia ďalšej farbiacej techniky, napr. za účelom zvýšenia kontrastu hemocytov;
- Technikou Trypanovej modrej bola potvrdená výhoda purifikácie s využitím Percollu – centrifugáciou dochádza k zakoncetrovaniu živých hemocytov v podobe prstenca a vrstve Percollu.
- Táto bakalárska práca tak prispela k optimalizácii metodík pre purifikáciu hemocytov, ich mikroskopickej analýzy, vrátane zhodnotenia ich životnosti, čo významne pomôže ich ďalšiemu štúdiu v rámci bunkovej imunity včiel.

6 LITERATURA

- Amdam, G., Aase, A., Seehuus, S., Kim Fondrk, M., Norberg, K., & Hartfelder, K. (2005). Social reversal of immunosenescence in honey bee workers. *Experimental Gerontology*, 40(12), 939-947. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2005.08.004>
- Amdam, G., Hartfelder, K., Norberg, K., Hagen, A., & Omholt, S. (2004). Altered Physiology in Worker Honey Bees (Hymenoptera: Apidae) Infested with the Mite Varroa destructor (Acari. *Journal of Economic Entomology*, 97(3), 741-747. <https://doi.org/10.1093/jee/97.3.741>
- An, C., Budd, A., Kanost, M., & Michel, K. (2011). Characterization of a regulatory unit that controls melanization and affects longevity of mosquitoes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(11), 1929-1939. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0543-z>
- An, C., Ishibashi, J., Ragan, E., Jiang, H., & Kanost, M. (2009). Functions of Manduca sexta Hemolymph Proteinases HP6 and HP8 in Two Innate Immune Pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 284(29), 19716-19726. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.007112>
- Ashida, M., Ochiai, M., & Niki, T. (1988). Immunolocalization of prophenoloxidase among hemocytes of the silkworm, Bombyx mori. *Tissue and Cell*, 20(4), 599-610. [https://doi.org/10.1016/0040-8166\(88\)90061-4](https://doi.org/10.1016/0040-8166(88)90061-4)
- Ates, G., Vanhaecke, T., Rogiers, V., & Rodrigues, R. (2017). Assaying Cellular Viability Using the Neutral Red Uptake Assay. *Cell Viability Assays*, 19-26. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6960-9_2
- Babcock, D., Brock, A., Fish, G., Wang, Y., Perrin, L., Krasnow, M., & Galko, M. (2008). Circulating blood cells function as a surveillance system for damaged tissue in Drosophila larvae. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(29), 10017-10022. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709951105>
- Baker, M., Wolanin, P., & Stock, J. (2006). Systems biology of bacterial chemotaxis. *Current Opinion in Microbiology*, 9(2), 187-192. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.02.007>
- Baracchi, D., Mazza, G., & Turillazzi, S. (2012). From individual to collective immunity: The role of the venom as antimicrobial agent in the Stenogastrinae wasp societies. *Journal of Insect Physiology*, 58(1), 188-193. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.11.007>
- Barribeau, S., Sadd, B., du Plessis, L., Brown, M., Buechel, S., Cappelle, K., Carolan, J., Christiaens, O., Colgan, T., Erler, S., Evans, J., Helbing, S., Karaus, E., Lattorff, H., Marxer, M., Meeus, I., Näpflin, K., Niu, J., Schmid-Hempel, R. et al. (2015). A depauperate immune repertoire precedes evolution of sociality in bees. *Genome Biology*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0628-y>
- Bedick, J., Tunaz, H., Nor Aliza, A., Putnam, S., Ellis, M., & Stanley, D. (2001). Eicosanoids act in nodulation reactions to bacterial infections in newly emerged adult honey bees, Apis mellifera, but not in older foragers, *I30(1)*, 107-117. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(01\)00226-5](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(01)00226-5)
- Boutros, M., Agaisse, H., & Perrimon, N. (2002). Sequential Activation of Signaling Pathways during Innate Immune Responses in Drosophila. *Developmental Cell*, 3(5), 711-722. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(02\)00325-8](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(02)00325-8)

- Brehelin, M., & Zachary, D. (1986). Insect haemocytes: a new classification to rule out controversy. *Immunity in Invertebrates*, 36-48.
- Bruno, D., Montali, A., Gariboldi, M., Wrońska, A., Kaczmarek, A., Mohamed, A., Tian, L., Casartelli, M., & Tettamanti, G. (2022). Morphofunctional characterization of hemocytes in black soldier fly larvae. *Insect Science*, 1-21. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.13111>
- Büyükgüzel, E., Tunaz, H., Stanley, D., & Büyükgüzel, K. (2007). Eicosanoids mediate *Galleria mellonella* cellular immune response to viral infection. *Journal of Insect Physiology*, 53(1), 99-105. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2006.10.012>
- Cao, X., He, Y., Hu, Y., Wang, Y., Chen, Y., Bryant, B., Clem, R., Schwartz, L., Blissard, G., & Jiang, H. (2015). The immune signaling pathways of *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 62, 64-74. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2015.03.006>
- Cerenius, L., Lee, B., & Söderhäll, K. (2008). The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends in Immunology*, 29(6), 263-271. <https://doi.org/10.1016/j.it.2008.02.009>
- Clark, K., Pech, L., & Strand, M. (1997). Isolation and Identification of a Plasmatocyte-spreading Peptide from the Hemolymph of the Lepidopteran Insect *Pseudoplusia includens*. *Journal of Biological Chemistry*, 272(37), 23440-23447. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.37.23440>
- Crowley, L., Marfell, B., Christensen, M., & Waterhouse, N. (2016). Measuring Cell Death by Trypan Blue Uptake and Light Microscopy. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(7). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087155>
- Danihlík, J. (2011). *Analýza parametrů humorální imunity včel* [Diplomová práce]. UP v Olomouci, Česká republika.
- Das, S., Dong, Y., Garver, L., & Dimopoulos, G. (2009). Specificity of the innate immune system: a closer look at the mosquito pattern-recognition receptor repertoire. *Insect Infection and Immunity*, 69-85. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780199551354.003.0005>
- de Graaf, D., Dauwe, R., Walravens, K., & Jacobs, F. (2002). Flow cytometric analysis of lectin-stained haemocytes of the honeybee (*Apis mellifera*). *Apidologie*, 33(6), 571-579. <https://doi.org/10.1051/apido:2002041>
- Dean, P., Potter, U., Richards, E., Edwards, J., Charnley, A., & Reynolds, S. (2004). Hyperphagocytic haemocytes in *Manduca sexta*. *Journal of Insect Physiology*, 50(11), 1027-1036. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2004.09.003>
- Diez, L., Deneubourg, J., & Detrain, C. (2012). Social prophylaxis through distant corpse removal in ants. *Naturwissenschaften*, 99(10), 833-842. <https://doi.org/10.1007/s00114-012-0965-6>
- Doublet, V., Poeschl, Y., Gogol-Döring, A., Alaux, C., Annoscia, D., Aurori, C., Barribeau, S., Bedoya-Reina, O., Brown, M., Bull, J., Flenniken, M., Galbraith, D., Genersch, E.,

- Gisder, S., Grosse, I., Holt, H., Hultmark, D., Lattorff, H., Le Conte, Y. et al. (2017). *BMC Genomics*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3597-6>
- Dudzic, J., Kondo, S., Ueda, R., Bergman, C., & Lemaitre, B. (2015). *Drosophila* innate immunity: regional and functional specialization of prophenoloxidasases. *BMC Biology*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s12915-015-0193-6>
- Durmuş, Y., Büyükgüzel, E., Terzi, B., Tunaz, H., Stanley, D., & Büyükgüzel, K. (2008). Eicosanoids mediate melanotic nodulation reactions to viral infection in larvae of the parasitic wasp, *Pimpla turionellae*. *Journal of Insect Physiology*, 54(1), 17-24. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2007.03.019>
- Eleftherianos, I., Xu, M., Yadi, H., French-Constant, R., & Reynolds, S. (2009). Plasmacyte-spreading peptide (PSP) plays a central role in insect cellular immune defenses against bacterial infection. *Journal of Experimental Biology*, 212(12), 1840-1848. <https://doi.org/10.1242/jeb.026278>
- Eleftherianos, I., & Revenis, C. (2010). Role and Importance of Phenoloxidase in Insect Hemostasis. *Journal of Innate Immunity*, 3(1), 28-33. <https://doi.org/10.1159/000321931>
- El-Mohandes, S., & Fawazy, A. (2010). Effect of different feeding diets on the haemolymph of the newly emerged honeybee workers *Apis mellifera* L. *Egypt. Acad. J. Biol. Sci.*, 3(1), 213 - 220.
- Evans, J., Aronstein, K., Chen, Y., Hetru, C., Imler, J., Jiang, H., Kanost, M., Thompson, G., Zou, Z., & Hultmark, D. (2006). Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect molecular biology*, 5(15), 645-656.
- Fearon, D. (1997). Seeking wisdom in innate immunity. *Nature*, 388(6640), 323-324. <https://doi.org/10.1038/40967>
- Fraiture, M., Baxter, R., Steinert, S., Chelliah, Y., Frolet, C., Quispe-Tintaya, W., Hoffmann, J., Blandin, S., & Levashina, E. (2009). Two Mosquito LRR Proteins Function as Complement Control Factors in the TEPI-Mediated Killing of Plasmodium, 5(3), 273-284. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.01.005>
- Frasch, M. (1999). Intersecting signalling and transcriptional pathways in *Drosophila* heart specification, 10(1), 61-71. <https://doi.org/10.1006/scdb.1998.0279>
- Frébortová, J. (2008). *Laboratorní cvičení z mikrobiologie* (1 ed.). Univerzita Palackého. https://www.prf.upol.cz/fileadmin/userdata/PrF/katedry/biochemie/Dokumenty/Materialy_k_vyuce/KBC-MBC_Laboratorni_cviceni_z_mikrobiologie_2023.pdf
- Frébortová, J. (2022). *Laboratorní cvičení z mikrobiologie*. Retrieved 2023-05-04, from https://www.prf.upol.cz/fileadmin/userdata/PrF/katedry/biochemie/Dokumenty/Materialy_k_vyuce/KBC-MBC_Laboratorni_cviceni_z_mikrobiologie_2023.pdf
- Freitag, D., Heckel, D., & Vogel, H. (2009). Bacterial feeding induces changes in immune-related gene expression and has trans-generational impacts in the cabbage looper (*Trichoplusia ni*). *Frontiers in Zoology*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/1742-9994-6-7>
- Gábor, E., Cinege, G., Csordás, G., Rusvai, M., Honti, V., Kolics, B., Török, T., Williams, M., Kurucz, É., & Andó, I. (2020). Identification of reference markers for characterizing

honey bee (*Apis mellifera*) hemocyte classes, 109.

<https://doi.org/10.1016/j.dci.2020.103701>

Gábor, E., Cinege, G., Csordás, G., Török, T., Folkl-Medzihradzky, K., Darula, Z., Andó, I., & Kurucz, É. (2017). Hemolymph expression reveals functional heterogeneity in honey bee (*Apis mellifera*) hemocytes, 76, 403-411. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.07.013>

Gandhe, A., John, S., & Nagaraju, J. (2007). Nodular, A Novel Immune Up-Regulated Protein Mediates Nodulation Response in Insects. *The Journal of Immunology*, 179(10), 6943-6951. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.10.6943>

Gillespie and, J., Kanost, M., & Trenczek, T. (1997). BIOLOGICAL MEDIATORS OF INSECT IMMUNITY. *Annual Review of Entomology*, 42(1), 611-643.

<https://doi.org/10.1146/annurev.ento.42.1.611>

Giri, D. (2019). *Wright's Stain : Preparation, Principle, Procedure and Results*.

LABORATORY TESTS.org. Retrieved 2023-05-08, from

<https://laboratorytests.org/wrights-stain/>

Gomez-Gutierrez, J., Bhutiani, N., McNally, M., Chuong, P., Yin, W., Jones, M., Zeiderman, M., Grizzle, W., & McNally, L. (2021). The neutral red assay can be used to evaluate cell viability during autophagy or in an acidic microenvironment in vitro.

Biochemic & Histochemistry, 96(4), 302-310.

<https://doi.org/10.1080/10520295.2020.1802065>

Gomez-Gutierrez, J., Bhutiani, N., McNally, M., Chuong, P., Yin, W., Jones, M., Zeiderman, M., Grizzle, W., & McNally, L. (2021). The neutral red assay can be used to evaluate cell viability during autophagy or in an acidic microenvironment in vitro.

Biotechnic & Histochemistry, 96(4), 302-310.

<https://doi.org/10.1080/10520295.2020.1802065>

Grigorian, M., & Hartenstein, V. (2013). Hematopoiesis and hematopoietic organs in arthropods. *Development Genes and Evolution*, 223(1-2), 103-115.

<https://doi.org/10.1007/s00427-012-0428-2>

Gupta, A. (1985). Cellular Elements in the Hemolymph. *Integument, Respiration and Circulation*, 401-451. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-030804-3.50016-9>

Hillyer, J. (2016). Insect immunology and hematopoiesis, 58, 102-118.

<https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.12.006>

Hillyer, J. (2016). Insect immunology and hematopoiesis, 58, 102-118.

<https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.12.006>

Hillyer, J., & Christensen, B. (2005). Mosquito Phenoloxidase and Defensin Colocalize in Melanization Innate Immune Responses. *J Histochem Cytochem*, 53(6), 689-698.

<https://doi.org/10.1369/jhc.4A6564.2005>

Hillyer, J., Schmidt, S., & Christensen, B. (2003a). Hemocyte-mediated phagocytosis and melanization in the mosquito *Armigeres subalbatus* following immune challenge by bacteria. *Cell and Tissue Research*, 313(1), 117-127. <https://doi.org/10.1007/s00441-003-0744-y>

<https://doi.org/10.1007/s00441-003-0744-y>

- Hillyer, J., Schmidt, S., & Christensen, B. (2003b). Rapid phagocytosis and melanization of bacteria and Plasmodium sporozoites by hemocytes of the mosquito *Aedes aegypti*. *J Parasitol*, 89(1), 62-69.
- Hillyer, J., & Strand, M. (2014). Mosquito hemocyte-mediated immune responses. *Current Opinion in Insect Science*, 3, 14-21. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2014.07.002>
- Hiroyasu, A., DeWitt, D., & Goodman, A. (2018). Extraction of Hemocytes from *Drosophila melanogaster* Larvae for Microbial Infection and Analysis. *JoVE Journal*, 135. <https://doi.org/10.3791/57077>
- Hoffmann, J., Kafatos, F., Janeway, C., & Ezekowitz, R. (1999). Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science*, 1313-1318.
- Honti, V., Csordás, G., Kurucz, É., Márkus, R., & Andó, I. (2014). The cell-mediated immunity of *Drosophila melanogaster*: Hemocyte lineages, immune compartments, microanatomy and regulation, 42(1), 47-56. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.06.005>
- Horner, R., Gassner, J., Kluge, M., Tang, P., Lippert, S., Hillebrandt, K., Moosburner, S., Reutzel-Selke, A., Pratschke, J., Sauer, I., & Raschzok, N. (2019). Impact of Percoll purification on isolation of primary human hepatocytes. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43042-8>
- Hystad, E., Salmela, H., Amdam, G., Münch, D., & Lee, B. (2017). Hemocyte-mediated phagocytosis differs between honey bee (*Apis mellifera*) worker castes. *PLOS ONE*, 12(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184108>
- Chain, B., Leyshon-Soland, K., & Siva-Jothy, M. (1992). Haemocyte heterogeneity in the cockroach *Periplaneta americana* analyzed using monoclonal antibodies. *Journal of Cell Science*, 1261-1267.
- Choe, K., Werner, T., Stöven, S., Hultmark, D., & Anderson, K. (2002). Requirement for a Peptidoglycan Recognition Protein (PGRP) in Relish Activation and Antibacterial Immune Responses in *Drosophila*. *Science*, 296(5566), 359-362. <https://doi.org/10.1126/science.1070216>
- Christensen, B., Li, J., Chen, C., & Nappi, A. (2005). Melanization immune responses in mosquito vectors. *Trends in Parasitology*, 21(4), 192-199. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.02.007>
- Christe, P., Oppliger, A., Bancalà, F., Castella, G., & Chapuisat, M. (2003). Evidence for collective medication in ants. *Ecology Letters*, 6(1), 19-22. <https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2003.00395.x>
- Ibrahim, S., & van den Engh, G. (2007). Flow Cytometry and Cell Sorting. *Cell Separation*, 19-39. https://doi.org/10.1007/10_2007_073
- Imler, J., & Bulet, P. (2005). Antimicrobial Peptides in *Drosophila*: Structures, Activities and Gene Regulation. *Mechanisms of Epithelial Defense*, 1-21. <https://doi.org/10.1159/000086648>
- Jefferson, J., Dolstad, H., Sivalingam, M., Snow, J., & Amdam, G. (2013). Barrier Immune Effectors Are Maintained during Transition from Nurse to Forager in the Honey Bee. *PLoS ONE*, 8(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054097>

- Jin, T., & Hereld, D. (2006). Moving toward understanding eukaryotic chemotaxis. *European Journal of Cell Biology*, 85(9-10), 905-913. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2006.04.008>
- Jiravanichpaisal, P., Lee, B., & Söderhäll, K. (2006). Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology*, 211(4), 213-236. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2005.10.015>
- Jung, S., Evans, C., Uemura, C., & Banerjee, U. (2005). The *Drosophila* lymph gland as a developmental model of hematopoiesis. *Development*, 132(11), 2521-2533. <https://doi.org/10.1242/dev.01837>
- Kadota, K., Walter, S., Claveria, F., Igarashi, I., Taylor, D., & Fujisaki, K. (2003). Morphological and Populational Characteristics of Hemocytes of *Ornithodoros moubata* Nymphs During the Ecdysial Phase. *Journal of Medical Entomology*, 40(6), 770-776.
- Kamei, R., Devi, O., Singh, S., & Singh, S. (2020). Roles and Biomedical Applications of Haemolymph Lectin. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 21(14), 1444-1450. <https://doi.org/10.2174/1389201021666200730123330>
- Kellner, R. (2002). The role of microorganisms for eggs and progeny. *Chemoecology of Insect Eggs and Egg Deposition*, 149-167.
- King, J., Hillyer, J., & Schneider, D. (2012). Infection-Induced Interaction between the Mosquito Circulatory and Immune Systems. *PLoS Pathogens*, 8(11). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003058>
- Koiwai, K., Alenton, R., Shiomi, R., Nozaki, R., Kondo, H., & Hirono, I. (2017). Two hemocyte sub-populations of kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*. *Molecular Immunology*, 85, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2017.01.024>
- Kuchel, R., Raftos, D., Birch, D., & Vella, N. (2010). Haemocyte morphology and function in the Akoya Pearl Oyster, *Pinctada imbricata*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 105(1), 36-48. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2010.04.011>
- Kurucz, É., Márkus, R., Zsámboki, J., Folkl-Medzihradzsky, K., Darula, Z., Vilmos, P., Udvardy, A., Krausz, I., Lukacsovich, T., Gateff, E., Zettervall, C., Hultmark, D., & Andó, I. (2007a). Nimrod, a Putative Phagocytosis Receptor with EGF Repeats in *Drosophila* Plasmatocytes. *Current Biology*, 17(7), 649-654. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.02.041>
- Kurucz, É., Váczi, B., Márkus, R., Laurinyecz, B., Vilmos, P., Zsámboki, J., Csorba, K., Gateff, E., Hultmark, D., & Andó, I. (2007b). Definition of *Drosophila* hemocyte subsets by cell-type specific antigens. *Acta Biologica Hungarica*, 58(1), 95-111. <https://doi.org/10.1556/ABiol.58.2007.Suppl.8>
- Kurucz, E., Zettervall, C., Sinka, R., Vilmos, P., Pivarcsi, A., Ekengren, S., Hegedüs, Z., Ando, I., & Hultmark, D. (2003). Hemese, a hemocyte-specific transmembrane protein, affects the cellular immune response in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(5), 2622-2627. <https://doi.org/10.1073/pnas.0436940100>
- Laughton, A., Boots, M., & Siva-Jothy, M. (2011). The ontogeny of immunity in the honey bee, *Apis mellifera* L. following an immune challenge. *Journal of Insect Physiology*, 57(7), 1023-1032. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.04.020>

- Laughton, A., Garcia, J., Altincicek, B., Strand, M., & Gerardo, N. (2011). Characterisation of immune responses in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Journal of Insect Physiology*, 57(6), 830-839. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.03.015>
- Lavine, M., & Strand, M. (2002). Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32(10), 1295-1309. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(02\)00092-9](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(02)00092-9)
- Lemaitre, B., & Hoffmann, J. (2007). The Host Defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual Review of Immunology*, 25(1), 697-743. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141615>
- Levashina, E., Moita, L., Blandin, S., Vriend, G., Lagueux, M., & Kafatos, F. (2001). Conserved Role of a Complement-like Protein in Phagocytosis Revealed by dsRNA Knockout in Cultured Cells of the Mosquito, *Anopheles gambiae*. *Cell*, 104(5), 709-718. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00267-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00267-7)
- Lindsay, S., & Wasserman, S. (2014). Conventional and non-conventional *Drosophila* Toll signaling. *Dev Comp Immunol*, 42(1), 16-24. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.04.011>
- Ling, E., Shirai, K., Kanekatsu, R., & Kiguchi, K. (2003). Classification of larval circulating hemocytes of the silkworm, *Bombyx mori*, by acridine orange and propidium iodide staining. *Histochemistry and Cell Biology*, 120(6), 505-511. <https://doi.org/10.1007/s00418-003-0592-6>
- Lourenço, A., Florecki, M., Simões, Z., & Evans, J. (2018). Silencing of *Apis mellifera* dorsal genes reveals their role in expression of the antimicrobial peptide defensin-1. *Insect Molecular Biology*, 27(5), 577-589. <https://doi.org/10.1111/imb.12498>
- Mamali, I., Lamprou, I., Karagiannis, F., Karakantza, M., Lampropoulou, M., & Marmaras, V. (2009). A β integrin subunit regulates bacterial phagocytosis in medfly haemocytes. *Developmental & Comparative Immunology*, 33(7), 858-866. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2009.02.004>
- Márkus, R., Laurinyecz, B., Kurucz, É., Honti, V., Bajusz, I., Sipos, B., Somogyi, K., Kronhamn, J., Hultmark, D., & Andó, I. (2009). Sessile hemocytes as a hematopoietic compartment in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(12), 4805-4809. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801766106>
- Marmaras, V., & Lampropoulou, M. (2009). Regulators and signalling in insect haemocyte immunity. *Cellular Signalling*, 21(2), 186-195. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2008.08.014>
- Marringa, W., Krueger, M., Burritt, N., & Burritt, J. (2014). Honey bee hemocyte profiling by flow cytometry. *PLoS one*, 9(10).
- Matskevich, A., Quintin, J., & Ferrandon, D. (2010). The *Drosophila* PRR GGBP3 assembles effector complexes involved in antifungal defenses independently of its Toll - pathway activation function. *European Journal of Immunology*, 40(5), 1244-1254. <https://doi.org/10.1002/eji.200940164>
- Maurer, F., John, T., Makhro, A., Bogdanova, A., Minetti, G., Wagner, C., & Kaestner, L. (2022). Continuous Percoll Gradient Centrifugation of Erythrocytes—Explanation of

- Cellular Bands and Compromised Age Separation. *Cells*, 11(8), 1296.
<https://doi.org/10.3390/cells11081296>
- McMenamin, A., Daughenbaugh, K., Parekh, F., Pizzorno, M., & Flenniken, M. (2018). Honey Bee and Bumble Bee Antiviral Defense. *Viruses*, 10(8).
<https://doi.org/10.3390/v10080395>
- Merchant, D., Ertl, R., Rennard, S., Stanley, D., & Miller, J. (2008). Eicosanoids mediate insect hemocyte migration. *Journal of Insect Physiology*, 54(1), 215-221.
<https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2007.09.004>
- Moret, Y., & Schmid-Hempel, P. (2001). Immune defence in bumble-bee offspring. *Nature*, 414(6863), 506-506. <https://doi.org/10.1038/35107138>
- Moyetta, N., Ramos, F., Leyria, J., Canavoso, L., & Fruttero, L. (2021). Morphological and Ultrastructural Characterization of Hemocytes in an Insect Model, the Hematophagous *Dipetalogaster maxima* (Hemiptera Reduviidae). *Insects*, 12(7), 2075-4450.
<https://doi.org/10.3390/insects12070640>
- Münch, D., Amdam, G., & Wolschin, F. (2008). Ageing in a eusocial insect: molecular and physiological characteristics of life span plasticity in the honey bee. *Functional Ecology*, 22(3), 407-421. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2008.01419.x>
- Muta, T., & Iwanaga, S. (1996). The role of hemolymph coagulation in innate immunity. *Current Opinion in Immunology*, 8(1), 41-47. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(96\)80103-8](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(96)80103-8)
- Myllymäki, H., & Rämet, M. (2014). JAK/STAT Pathway in Drosophila Immunity. *Scandinavian Journal of Immunology*, 79(6), 377-385. <https://doi.org/10.1111/sji.12170>
- Nappi, A., & Christensen, B. (2005). Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: Applications to insect innate immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35(5), 443-459. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2005.01.014>
- Nardi, J., Pilas, B., Bee, C., Zhuang, S., Garsha, K., & Kanost, M. (2006). Neuroglian-positive plasmatocytes of *Manduca sexta* and the initiation of hemocyte attachment to foreign surfaces. *Developmental & Comparative Immunology*, 30(5), 447-462.
<https://doi.org/10.1016/j.dci.2005.06.026>
- Negri, P., Maggi, M., Ramirez, L., De Feudis, L., Szwariski, N., Quintana, S., Eguaras, M., & Lamattina, L. (2015). Abscisic acid enhances the immune response in *Apis mellifera* and contributes to the colony fitness. *Apidologie*, 46(4), 542-557.
<https://doi.org/10.1007/s13592-014-0345-7>
- Negri, P., Maggi, M., Ramirez, L., Szawarski, N., De Feudis, L., Lamattina, L., & Eguaras, M. (2016). Cellular immunity in *Apis mellifera*: studying hemocytes brings light about bees skills to confront threats. *Apidologie*, 47(3), 379-388. <https://doi.org/10.1007/s13592-015-0418-2>
- Osta, M., Christophides, G., & Kafatos, F. (2004). Effects of Mosquito Genes on Plasmodium Development. *Science*, 303(5666), 2030-2032.
<https://doi.org/10.1126/science.1091789>

- Palmer, W., & Jiggins, F. (2015). Comparative Genomics Reveals the Origins and Diversity of Arthropod Immune Systems. *Molecular Biology and Evolution*, 32(8), 2111-2129. <https://doi.org/10.1093/molbev/msv093>
- Parker, J., Mizuguchi, K., & Gay, N. (2001). A family of proteins related to Spätzle, the toll receptor ligand, are encoded in the Drosophila genome. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 45(1), 71-80. <https://doi.org/10.1002/prot.1125>
- Parrinello, D., Parisi, M., Parrinello, N., & Cammarata, M. (2020). Ciona robusta hemocyte populational dynamics and PO-dependent cytotoxic activity, 103. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2019.103519>
- Pech, L., & Strand, M. (1996). Granular cells are required for encapsulation of foreign targets by insect haemocytes. *Journal of Cell Science*, 109(8), 2053-2060. <https://doi.org/10.1242/jcs.109.8.2053>
- Pech, L., & Strand, M. (1995). Encapsulation of foreign targets by hemocytes of the moth *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) involves an RGD-dependent cell adhesion mechanism. *Journal of Insect Physiology*, 41(6), 481-488. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(94\)00136-5](https://doi.org/10.1016/0022-1910(94)00136-5)
- Piaton, E., Fabre, M., Goubin-Versini, I., Bretz-Grenier, M., Courtade-Saïdi, M., Vincent, S., Belleannée, G., Thivolet, F., Boutonnat, J., Debaque, H., Fleury-Feith, J., Vielh, P., Cochand-Priollet, B., Egelé, C., Bellocq, J., & Michiels, J. (2015). Recommandations techniques et règles de bonne pratique pour la coloration de May-Grünwald-Giemsa revue de la littérature et apport de l'assurance qualité. *Annales de Pathologie*, 35(4), 294-305. <https://doi.org/10.1016/j.annpat.2015.05.019>
- Praparatana, R., Maskaew, S., Thongsoi, R., Runsaeng, P., & Utarabhand, P. (2022). Galectin, another lectin from *Fenneropenaeus merguensis*, contributed in shrimp immune defense. *Journal of Invertebrate Pathology*, 190. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2022.107738>
- Ratcliffe, N., Rowley, A., Fitzgerald, S., & Rhodes, C. (1985). Invertebrate Immunity: Basic Concepts and Recent Advances. *International Review of Cytology*, 97, 183-350. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)62351-7](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)62351-7)
- Ratcliffe, N., & Gagen, S. (1977). Studies on the in vivo cellular reactions of insects: An ultrastructural analysis of nodule formation in *Galleria mellonella*. *Tissue and Cell*, 9(1), 73-85. [https://doi.org/10.1016/0040-8166\(77\)90050-7](https://doi.org/10.1016/0040-8166(77)90050-7)
- Reavey, ., Beare, L., & Cotter, S. (2014). Parental care influences social immunity in burying beetle larvae. *Ecological Entomology*, 39(3), 395-398.
- Ribeiro, C., & Brehélin, M. (2006). Insect haemocytes: What type of cell is that?. *Journal of Insect Physiology*, 52(5), 417-429. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2006.01.005>
- Rosengaus, R., Malak, T., & MacKintosh, C. (2013). Immune-priming in ant larvae: social immunity does not undermine individual immunity. *Biology Letters*, 9(6). <https://doi.org/10.1098/rsbl.2013.0563>
- Rothentbuhler, W., & Thompson, V. (1956). Resistance to American Foulbrood in Honey Bees. I. Differential Survival of Larvae of Different Genetic Lines1. *Journal of Economic Entomology*, 49(4), 470-475. <https://doi.org/10.1093/jee/49.4.470>

- Rozen, D., Engelmoer, D., & Smiseth, P. (2008). Antimicrobial strategies in burying beetles breeding on carrion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(46), 17890-17895. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805403105>
- Rus, F., Kurucz, É., Márkus, R., Sinenko, S., Laurinyecz, B., Pataki, C., Gausz, J., Hegedűs, Z., Udvardy, A., Hultmark, D., & Andó, I. (2006). Expression pattern of Filamin-240 in *Drosophila* blood cells. *Gene Expression Patterns*, *6*(8), 928-934. <https://doi.org/10.1016/j.modgep.2006.03.005>
- Sadd, B., Kleinlogel, Y., Schmid-Hempel, R., & Schmid-Hempel, P. (2005). Trans-generational immune priming in a social insect. *Biology Letters*, *1*(4), 386-388. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2005.0369>
- Satyavathi, V., Minz, A., & Nagaraju, J. (2014). Nodulation: An unexplored cellular defense mechanism in insects. *Cellular Signalling*, *26*(8), 1753-1763. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.02.024>
- Shi, H., Wang, J., & Yu, Q. (1995). Simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide to determine isolated cochlear outer hair cell viability of guinea pig. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi*, *30*(3), 152-153.
- Schmid, M., Brockmann, A., Pirk, C., Stanley, D., & Tautz, J. (2008). Adult honeybees (*Apis mellifera* L.) abandon hemocytic, but not phenoloxidase-based immunity. *Journal of Insect Physiology*, *54*(2), 439-444. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2007.11.002>
- Schmidt, O., Theopold, U., & Strand, M. (2001). Innate immunity and its evasion and suppression by hymenopteran endoparasitoids. *BioEssays*, *23*(4), 344-351. <https://doi.org/10.1002/bies.1049>
- Sigle, L., & Hillyer, J. (2016). Mosquito hemocytes preferentially aggregate and phagocytose pathogens in the periostial regions of the heart that experience the most hemolymph flow. *Developmental & Comparative Immunology*, *55*, 90-101. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.10.018>
- Simone-Finstrom, M., & Spivak, M. (2010). Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees. *Apidologie*, *41*(3), 295-311. <https://doi.org/10.1051/apido/2010016>
- Spivak, M., & Reuter, G. (2001). Resistance to American foulbrood disease by honey bee colonies *Apis mellifera* bred for hygienic behavior. *Apidologie*, *32*(6), 555-565. <https://doi.org/10.1051/apido:2001103>
- Stanley, D., & Kim, Y. (2019). Prostaglandins and Other Eicosanoids in Insects: Biosynthesis and Biological Actions. *Invertebrate Physiology: Frontiers in physiology*, *9*(1927). <https://doi.org/doi.org/10.3389/fphys.2018.01927>
- Stanley, D., Miller, J., & Tunaz, H. (2009). Eicosanoid Actions in Insect Immunity. *Journal of Innate Immunity*, *1*(4), 282-290. <https://doi.org/10.1159/000210371>
- Stanley, D., & Shapiro, M. (2007). Eicosanoid biosynthesis inhibitors increase the susceptibility of *Lymantria dispar* to nucleopolyhedrovirus LdMNPV. *Journal of Invertebrate Pathology*, *95*(2), 119-124. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.02.002>

- Stanley, D., & Miller, J. (2006). Eicosanoid actions in insect cellular immune functions. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 119(1), 1-13. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2006.00406.x>
- Starks, P., Blackie, C., & Seeley, T. (2000). Fever in honeybee colonies. *Naturwissenschaften*, 87(5), 229-231. <https://doi.org/10.1007/s001140050709>
- Stender, A. (2019). Performing Spectroscopy on Plasmonic Nanoparticles with Transmission-Based Nomarski-Type Differential Interference Contrast Microscopy. *Journal of Visualized Experiments*, (148). <https://doi.org/10.3791/59411>
- Strand, M. (2008). The insect cellular immune response. *Insect Science*, 15, 1-14.
- Tepass, U., Fessler, L., Aziz, A., & Hartenstein, V. (1994). Embryonic origin of hemocytes and their relationship to cell death in *Drosophila*. *Development*, 120(7), 1829-1837. <https://doi.org/10.1242/dev.120.7.1829>
- Traniello, J., Rosengaus, R., & Savoie, K. (2002). The development of immunity in a social insect: Evidence for the group facilitation of disease resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(10), 6838-6842. <https://doi.org/10.1073/pnas.102176599>
- Trauer-Kizilelma, U., & Hilker, M. (2015). Impact of transgenerational immune priming on the defence of insect eggs against parasitism, 51(1), 126-133. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.03.004>
- Ugelvig, L., & Cremer, S. (2007). Social Prophylaxis: Group Interaction Promotes Collective Immunity in Ant Colonies. *Current Biology*, 17(22), 1967-1971. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.10.029>
- Vacl, M. (2015). *Antimikrobiální aktivita hemolymfy včely medonosné, Apis mellifera L.* [Diplomová práce]. MU Brno.
- Vass, E., & Nappi, A. (2001). Fruit Fly Immunity: The fruit fly provides a suitable experimental model for studying various aspects of the cellular and humoral mechanisms, genetics, signaling cascades, and cytotoxic molecules involved in insect innate immunity. *BioScience*, 7(51), 529-535.
- Vašíček, O. (2009). *Respirační vzplanutí hmyzích fagocytů* [Diplomová práce]. MU Brno.
- Vilmos, P. (2004). A rapid rosetting method for separation of hemocyte sub-populations of *Drosophila melanogaster*. *Developmental and comparative immunology*, 28(6), 555-563. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2003.10.001>
- Vilmos, P., & Kurucz, É. (1998). Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. *Immunology Letters*, 62(2), 59-66. [https://doi.org/10.1016/S0165-2478\(98\)00023-6](https://doi.org/10.1016/S0165-2478(98)00023-6)
- Volz, J., Muller, H., Zdanowicz, A., Kafatos, F., & Osta, M. (2006). A genetic module regulates the melanization response of *Anopheles* to *Plasmodium*. *Cellular Microbiology*, 8(9), 1392-1405. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00718.x>
- Walker, T., & Hughes, W. (2009). Adaptive social immunity in leaf-cutting ants. *Biology Letters*, 5(4), 446-448. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2009.0107>

- Wallberg, F., Tenev, T., & Meier, P. (2016). Analysis of Apoptosis and Necroptosis by Fluorescence-Activated Cell Sorting. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(4). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087387>
- Wang, J., Zhang, Q., Tang, L., Chen, L., Liu, X., & Wang, Y. (2014b). Involvement of a pattern recognition receptor C-type lectin 7 in enhancing cellular encapsulation and melanization due to its carboxyl-terminal CRD domain in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *Developmental & Comparative Immunology*, 44(1), 21-29. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.11.002>
- Wang, X., Fuchs, J., Infanger, L., Rocheleau, T., Hillyer, J., Chen, C., & Christensen, B. (2005). Mosquito innate immunity: involvement of β 1,3-glucan recognition protein in melanotic encapsulation immune responses in *Armigeres subalbatus*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 139(1), 65-73. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2004.09.009>
- Wilson-Rich, N., Dres, S., & Starks, P. (2008). The ontogeny of immunity: Development of innate immune strength in the honey bee (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology*, 54(10-11), 1392-1399. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2008.07.016>
- Wilson-Rich, N., Spivak, M., Fefferman, N., & Starks, P. (2009). Genetic, Individual, and Group Facilitation of Disease Resistance in Insect Societies. *Annual Review of Entomology*, 54(1), 405-423. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.53.103106.093301>
- Wojda, I., Kowalski, P., & Jakubowicz, T. (2004). JNK MAP kinase is involved in the humoral immune response of the greater wax moth larvae *Galleria mellonella*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 56(4), 143-154. <https://doi.org/10.1002/arch.20001>
- Xu, J., & Cherry, S. (2014). Viruses and antiviral immunity in *Drosophila*. *Dev Comp Immunol*, 42(1), 67-84. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.05.002>
- Yokohama, H., Danjo, T., Ogawa, K., & Wakabayashi, H. (1997). A vital staining technique with fluorescein diacetate (FDA) and propidium iodide (PI) for the determination of viability of myxosporean and actinosporean spores. *Journal of Fish Diseases*, (20), 281-286.
- Yu, Y., Cao, Y., Xia, Y., & Liu, F. (2016). Wright–Giemsa staining to observe phagocytes in *Locusta migratoria* infected with *Metarhizium acridum*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 139, 19-24. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2016.06.009>
- Zhang, K., & Zhang, X. (2021). Haemocyte variations in 35 species of grasshoppers and locusts. *Science Progress*, 104(4). <https://doi.org/10.1177/00368504211053551>
- Zhang, W., Tettamanti, G., Bassal, T., Heryanto, C., Eleftherianos, I., & Mohamed, A. (2021). Regulators and signalling in insect antimicrobial innate immunity: Functional molecules and cellular pathways. *Cellular Signalling*, 83. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.110003>
- Zhang, X., He, Y., Cao, X., Gunaratna, R., Chen, Y., Blissard, G., Kanost, M., & Jiang, H. (2015). Phylogenetic analysis and expression profiling of the pattern recognition receptors: Insights into molecular recognition of invading pathogens in *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 62, 38-50. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2015.02.001>

- Zhao, X., Ferdig, M., Li, J., & Christensen, B. (1995). Biochemical pathway of melanotic encapsulation of *Brugia malayi* in the mosquito, *Armigeres subalbatus*. *Developmental & Comparative Immunology*, *19*(3), 205-215. [https://doi.org/10.1016/0145-305X\(95\)00005-E](https://doi.org/10.1016/0145-305X(95)00005-E)
- Zibae, A., Bandani, A., & Malagoli, D. (2011). Purification and characterization of phenoloxidase from the hemocytes of *Eurygaster integriceps* (Hemiptera Scutelleridae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, *158*(1), 117-123. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2010.10.006>

7 ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK

AmP	antimikrobiálne peptidy
BF	svetelné pole (z angl. bright field)
DAPI	4',6-diamidino-2-fenylindol
dH ₂ O	deionizovaná voda
DIC	Nomarského diferenčiacny interferenčný kontrast (z angl. differential interference contrast)
Dome	bunkový receptor „Domeless“
DOPA	3,4-dihydroxyfenylalanín
DSCAM	molekuly príľnavé k bunkám Downovho syndrómu
exp.	expozícia
FDA	fluoresceíndiacetát
FREP	proteíny príbuzné fibrinogénu
Gcm	Glial cells missing
Gcm2	Glial cells missing 2
HC	hemocyt
HC-100	frakcia hemocytov o objeme 100μl
HC-95	frakcia hemocytov o objeme 95 μl
HL	hemolymfa
IIF	nepriama imunofluorescencia
Imd	Imunitná deficiencia
IMP	myo-inositol monophosphatasa (insulin-like growth factor 2 (IGF2))
JAK/STAT	Janus kinasa/signal transducer and activation of transkription
JKN	kinasa „Hopscotch“
LOX	lipogenasa
LPA	kyselina lipoteichoová
LRR	proteíny s doménami bohatými na leucín
MAb	monoklonálna protilátka
MAMP	molekulárne vzory asociované s mikróbami
NČ	neutrálne červeň
PAMP	molekulárne vzory asociované s patogénmi
PBS	fosfátový pufor

PG	prostaglandíny
PGRP	proteíny rozpoznávajúce peptidoglykany
PGRP-LC	receptor rozpoznávajúci peptidoglykany LC
PGRP-LE	receptor rozpoznávajúci peptidoglykany LE
PI	Propium jodid
PIAS	inhibítor proteínov aktivovanej STAT
PPO	pro-fenooxidasová kaskáda
PRR	receptory rozpoznávajúce vzory
PTU	fenylthiomočovina
Ras-MAPK	
dráha	MAPK: proteínové kinasy aktivované mitogénom
RGD	Arg-Gly-Arg sekvencia
RNAi	RNA interferencia
SOCS	supresor cytokínovej signalizácie
SP	serínové proteasy
SPE	spätzle-processing enzzyne
Spz	spätzle
SR-C	receptor Class S Scavenger
TB	Trypanová modrá
TEM	transmisná elektrónová mikroskopia
TLR	receptory podobné Toll
Tot	Turandot
Upd	cytokín „Unpaired“
μl	mikroliter