

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2022/2023

Bc. Hana Krykorková

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Identifikace biomarkerů imunotoxicity u kroužkovců pro ekotoxikologické testy

Diplomová práce

2022/2023

Bc. Hana Krykorková

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Hana Krykorková**
Osobní číslo: **C21453**
Studijní program: **N0914P360001 Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**
Téma práce: **Identifikace biomarkerů imunotoxicity u kroužkvců pro ekotoxikologické testy**
Téma práce anglicky: **The Identification Of Immunotoxic Biomarkers In Annelids For Ecotoxicological Tests**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

1. Popište stručně problematiku ekotoxikologie a laboratorních biotestů jako nástrojů ochrany životního prostředí a zdraví člověka. Zaměřte se zejména na trendy týkající se citlivých ukazatelů toxicity, jako je imunotoxicita, genotoxicita, oxidativní stres apod.
2. Zaměřte se na metody testování imunotoxicity pomocí buněčných *in vitro* testů a testů prováděných na zvířatech. Popište, které složky imunitního systému se při testech sledují a proč.
3. Popište anatomii a fungování imunitního systému kroužkvců. Pokuste se nalézt co nejvíce informací týkající se roupic (*Enchytraeidae*) a žížalíc (*Lumbriculidae*) a zaměřte se na buňky se schopností fagocytózy.
4. Z dostupné literatury vypracujte rešerši shrnující experimentální postupy či metody pro posuzování imunotoxicity látek pro kroužkovce. Odbornou literaturu čerpejte z doporučených databází a časopisů, monografií.

Experimentální část:

1. Optimalizujte postup získávání coelomocytů z živých kroužkvců pro následnou analýzu pomocí optického mikroskopu či průtokového cytometru.
2. Ověřte možnost přímé analýzy vybraných biomarkerů imunotoxicity přímo v homogenátu tkáně kroužkvců.
3. Funkčnost metod sledujících vybrané biomarkery imunotoxicity ověřte pomocí ekotoxikologických testů.

Rozsah pracovní zprávy: **35 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

viz bod 4, teoretická část

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Marcela Slováková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Konzultanti diplomové práce: **Ing. Kateřina Sýkorová, Ph.D.**
Ústav environmentálního a chemického inženýrství
prof. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.
Katedra biologických a biochemických věd
RNDr. Karel Královec, Ph.D.
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce: **23. prosince 2022**

Termín odevzdání diplomové práce: **5. května 2023**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2023

PROHLÁŠENÍ AUTORA

Prohlašuji:

Práci s názvem Identifikace biomarkerů imunotoxicity u kroužkoců pro ekotoxikologické testy jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 5. 5. 2023

Bc. Hana Krykorková v. r.

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych ráda poděkovala paní prof. RNDr. Zuzaně Bílkové, Ph.D., Mgr. Marcele Slovákové, Ph.D. a Ing. Kateřině Sýkorové, Ph.D., za odborné konzultace, vstřícnost, ochotu a čas, který mi věnovaly při vedení této práce. Rovněž bych chtěla poděkovat za ochotu, čas i cenné rady paní Mgr. Pavlíně Nývltové, Ph.D. a panu Mgr. Janu Čapkovi Ph.D., který mi věnovali po celou dobu práce na spektrofluorimetrickém přístroji. Dále mé díky patří panu RNDr. Karlu Královci Ph.D., který mi mimo jiné pomohl při měření na průtokovém cytometru, tak i na fluorescenčním mikroskopu. V neposlední řadě děkuji i Ing. Dominice Josefové za odborné vedení experimentální části a Mgr. Nikole Mannové za všestrannou pomoc na průtokovém cytometru. Jako poslední děkuji své rodině a přátelům za podporu v průběhu celého studia.

ANOTACE

Teoretická část diplomové práce se zabývá identifikací jednotlivých biomarkerů imunotoxicity u kroužkovců. Práce dále popisuje fungování imunitního systému člověka i kroužkovců a klade důraz na popis metod testování imunotoxicity látek. V experimentální části je práce věnována optimalizovaným postupům detekce působení imunotoxické látky hexahydrátu chloridu nikelnatého na organismus rouspice *Enchytraeus crypticus*. Koncentrace toxické látky jsou stanovovány na takové úrovni, která testovaný organismus neusmrtí, ale ovlivní jej na biologické úrovni.

KLÍČOVÁ SLOVA

Imunotoxicita, coelomocyty, rouspice *Enchytraeus crypticus*, chlorid nikelnatý, riboflavin

TITLE

The identification of immunotoxic biomarkers in annelids for ecotoxicological tests.

ANNOTATION

The theoretical part of the thesis deals with the identification of individual biomarkers of immunotoxicity in annelids. The thesis also describes the functioning of the immune system in humans and annelids and emphasizes the description of methods for testing immunotoxicity of substances. The experimental part of the thesis is devoted to optimized procedures for detection of immunotoxicity of nickel chloride hexahydrate on the *Enchytraeus crypticus*. Concentrations of the toxic substance are set at a level that will not kill the test organism but will affect it at a biological level.

KEYWORDS

Immunotoxicity, coelomocytes, *Enchytraeus crypticus*, nickel chloride, riboflavine

OBSAH

Úvod.....	13
1 Teoretická část	15
1.1 Ekotoxikologie a citlivé ukazatele toxicity	15
1.1.1 Oxidativní stres	16
1.1.2 Genotoxicita.....	17
1.1.3 Teratogenita	18
1.1.4 Imunotoxicita	18
1.2 Kroužkovci (<i>Annelida</i>).....	20
1.2.1 Roupice <i>Enchytraeus crypticus</i>	21
1.3 Imunitní systém člověka a kroužkovců	23
1.3.1 Imunitní systém člověka	23
1.3.2 Základní složky imunitního systému člověka.....	23
1.3.3 Imunitní systém kroužkovců.....	29
1.4 Testy imunotoxicity u člověka a kroužkovců	32
1.4.1 Metody testování imunotoxicity u člověka.....	32
1.4.2 Metody hodnocení imunotoxicity látek u bezobratlých	36
2 Cíle práce	40
3 Experimentální část.....	41
3.1.1 Příprava roztoků.....	41
3.2 Materiál	42
3.2.1 Modelové organismy	42
3.2.2 Laboratorní pomůcky.....	42
3.2.3 Laboratorní přístroje	42
3.2.4 Seznam chemikálií a reagentů	43
3.3 Podmínky laboratorního chovu roupic.....	44
3.4 Test toxicity ve vodném prostředí.....	45

3.5	Metody získávání buněčných suspenzí	46
3.5.1	Počítání na Bürkerové komůrce.....	48
3.5.2	Využití průtokové cytometrie	50
3.6	Sledování obsahu riboflavinu v eleocytech fluorimetricky	51
3.6.1	Analýza extrudovaných buněk z buněčných suspenzí.....	51
3.6.2	Analýza homogenátu tkáně roupic	52
3.6.3	Fluorescenční detekce riboflavinu v eleocytech.....	52
3.6.4	Fluorimetrická detekce riboflavinu v eleocytech.....	52
3.7	Design testu s optimalizovanými postupy stanovení biomarkerů imunotoxicity	53
4	Výsledky a diskuze	54
4.1	Optimalizace extruze coelomocytů z dutiny coelomu	55
4.2	Analýza buněk v optickém a fluorescenčním mikroskopu	56
4.3	Test toxicity ve vodném prostředí.....	59
4.4	Počítání buněk v Bürkerově komůrce	63
4.5	Fluorimetrické sledování obsahu riboflavinu v eleocytech	65
4.6	Analýza na průtokovém cytometru	68
4.7	Posouzení vhodnosti coelomocytů jako biomarkerů imunotoxicity	74
5	Závěr	76
6	Použitá literatura	78

SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

Obrázek 1 - Vybrané příklady biomarkerů toxicity látek využitelných v ekotoxikologii, vlastní zdroj.	19
Obrázek 2 - Stavba těla žížaly, převzato z [36].	20
Obrázek 3 - Tělní stavba roupice <i>Enchatraeus crypticus</i> , kde A: je dorsoventrální pohled na přední část těla; B: spermatéka; C: coelomové buňky; D: semenná nálevka; E: semenná žláza; F: štětiny s váčkovitými buňkami; b: mozek; cl: opasek; do: vyvíjející se vajíčka; dsg: dorsální lalok třetího páru septálních žláz; pb: hltanový váček; pe: semenný váček; pn: peptonefridium; sf: semenná nálevka; st: spermatéka; so: semenný váček; vo: vitelogenní vajíčko; vsg: ventrální lalok třetího páru septálních žláz [41].	22
Obrázek 4 – Jednotlivé fáze fagocytózy, obrázek převzat a upraven z Russell a kol., 2011 [45; 47].	24
Obrázek 5 - Role T a B lymfocytů ve specifické imunitní odpovědi, převzato a upraveno z [42].	26
Obrázek 6 - Struktura protilátky IgG, která je tvořena ze dvou identických těžkých (červená a modrá) a dvou identických lehkých (žlutá a zelená) řetězců. Horní část (Fab) je složena ze dvou variabilních oblastí a každá váže stejný antigen. Spodní oblast (Fc) interaguje s buněčnými receptory či komplementem. Obrázek byl převzán a upraven z [49].	27
Obrázek 7 - Pět hlavních izotypů protilátek a jejich funkce v imunitní odpovědi, obrázek byl upraven a převzat z [49].	28
Obrázek 8 - Základní rozdělení imunitního systému, vlastní zdroj.	28
Obrázek 9 - Souhrnné rozdělení specifické imunitní odpovědi, vlastní zdroj.	29
Obrázek 10 - Souhrnné znázornění složek imunitního systému kroužkovců, vlastní zdroj.	31
Obrázek 11 - Očištění roupic <i>E. crypticus</i> ve vodě.	45
Obrázek 12 - Struktura riboflavinu, obrázek převzat z [95].	51
Obrázek 13 - Tři typy coelomocytů ve fázovém kontrastu v optickém mikroskopu, kde gA je granulární amébocyt; hA je hyalinní amébocyt a E je eleocyt.	56
Obrázek 14 - Hyalinní amébocyt po MGG obarvení.	57
Obrázek 15 - Fluorescenční eleocyty v kontrolním vzorku, kde a) je fázový kontrast; b) autofluorescence; c) sloučení.	57
Obrázek 16 - Autofluorescenční eleocyt v homogenátu tkáně roupic, kde a) fázový kontrast; b) autofluorescence; c) sloučení.	58

Obrázek 17 - Vyhodnocení limitního testu, pod a) kontrolní vzorek obsahující rekonstituovanou vodu s 25 živými dospělými roupicemi; b) vzorek obsahující 100 mg/l testované toxické látky (NiCl ₂) se 100% mortalitou.	59
Obrázek 18 – Nasazení definitivního ekotoxikologického testu do 25ml skleněných kádinek.	60
Obrázek 19 – Srovnání dvou eleocytů, kde a) kompletní eleocyt, b) polorozpadlý eleocyt.	63
Obrázek 20 – Srovnání histogramů kontrolního vzorku coelomocytů, kde je a) kontrolní vzorek <i>E. crypticus</i> zpracovaný ultrazvukovou vodní lázní s označenými subpopulacemi R1 a R2 (horní část), u nichž by se pravděpodobně mohlo jednat o eleocyty a dále subpopulace R3 a R4 (dolní část), které by mohly být amébocyty (granulární a hyalinní); b) fluorescence kontrolního vzorku s oblastmi R7 a R8 z označené subpopulace R2 (vpravo nahoře u Obr. 20a); c) kontrolní vzorek <i>E. fetida</i> s označenými subpopulacemi E (eleocyty) A (amébocyty) ze studie [93]; d) kontrolní vzorek zpracovaný ultrazvukovou extruzní metodou ze studie [81]	69
Obrázek 21 – Pilotní histogramy počtů buněk z ekotoxikologického testu, kde jsou a) buňky v koncentraci 4,2 mg/l NiCl ₂ se „zažetovanými“ populacemi – R1 a R2 (horní dvě oblasti) by mohly být pravděpodobně eleocyty lišící se jen svou velikostí, R3 a R4 (dolní dvě oblasti) by mohly být hyalinní a granulární amébocyty, v druhé části obrázku (vpravo) je vybraná fluorescence (R7, R8) pro označené R2 buňky (vpravo nahoře); b) koncentrace 4,4 mg/l NiCl ₂ se svou fluorescencí; c) koncentrace 5 mg/l NiCl ₂ se svou fluorescencí.	71
Obrázek 22 – Pilotní histogramy počtů buněk z ekotoxikologického testu, kde jsou a) buňky v koncentraci 7,5 mg/l NiCl ₂ se „zažetovanými“ populacemi – R1 a R2 (horní dvě oblasti) by mohly být pravděpodobně eleocyty lišící se jen svou velikostí, R3 a R4 (dolní dvě oblasti) by mohly být hyalinní a granulární amébocyty, v druhé části obrázku (vpravo) je vybraná fluorescence (R7, R8) pro označené R2 buňky (vpravo nahoře); b) koncentrace 10 mg/l NiCl ₂ se svou fluorescencí; c) koncentrace 12,55 mg/l NiCl ₂ se svou fluorescencí.	72

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

CBE	extrakt cyanobakteriálního květu (angl. Cyanobacterial extract)
CCK-8	kit pro počítání buněk (angl. Cell Counting Kit-8)
DAPI	4',6-Diamidin-2-fenylindol
DNA	deoxyribonukleová kyselina (angl. Deoxyribonucleic acid)
ELISA	(angl. Ezyme-Linked Immuno Sorbent Assay)
EC ₅₀	polovina maximální účinné koncentrace (angl. Half Maximal Effective Concentration)
FITC	(angl. Fluorescein Isothiocyanate)
FSC	přímý rozptyl (angl. Forward Scatter)
HBSS	Hankův fyziologický roztok (angl. Hanks Balanced Salt Solution)
HIS	histidin
IS	imunitní systém (angl. Immune System)
LBSS	(angl. Lumbricus Balanced Salt Solution)
LOAEC	nejnižší koncentrace s pozorovaným nepříznivým účinkem (angl. Lowest Observable Adverse Effect Concentration)
MDA	malondialdehyd
MGG	barvení podle May-Grünwald a Giemsa-Romanowski
MTT	methyl-thiazolyl- tetrazolium
NADH	nikotinamidadeninukleotid
NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát
NBT	nitrobluetetrazolium
NK	přírozený zabiják (angl. Natural Killer)

NOAEC	koncentrace bez pozorovaného nepříznivého účinku (angl. No Observable Adverse Effect Concentration)
PBS	fosfátový fyziologický roztok (angl. Phosphate-Buffered Saline)
PCR	polymerázová řetězová reakce (angl. Polymerase Chain Reaction)
ROS	reaktivní formy kyslíku (angl. Reactive Oxygen Species)
RNS	reaktivní formy dusíku (angl. Reactive Nitrogen Species)
RPMI	(angl. Roswell Park Memorial Institute medium)
SOD	superoxiddizmutáza
SSC	boční rozptyl (angl. Side Scatter)
THP-1	monocytární buněčná linie „Tohoku Hospital Pediatrics 1“

ÚVOD

Následkem masivního rozvoje chemického průmyslu dochází k obrovským únikům toxických látek do životního prostředí. Kontaminují se jak půdní, tak i vodní ekosystémy, ale i ovzduší. Předmětem této práce bylo sledování bezobratlých živočichů pro záchyt látek, které mají intoxikační účinky na životní prostředí, včetně všech organismů.

Prostřednictvím moderní ekotoxikologie lze včas identifikovat látky, které jsou toxické pro půdní organismy. Jako běžné indikátory v půdách se jeví kroužkovci. Ti hrají zásadní roli při zachování půdní struktury a úrodnosti. Kroužkovci dokáží pohlcovat organické a anorganické částice půdy. Běžně jsou tak kroužkovci využíváni k posouzení akutní toxicity kovů, pesticidů, popřípadě k určení subletálních účinků působením léčiv (xenobiotik). Všechny tyto látky mají určitý dopad na imunitní systém, který je extrémně citlivý na jakékoliv toxické látky. Ovlivnění imunitního systému kroužkovců může být v takových případech zdánlivě malé, ale vyvolává ve svém důsledku fatální změny. Tyto změny v imunitním systému se často projevují zvýšenou morbiditou a mortalitou postižených organismů. Zmíněné změny na úrovni imunitního systému lze použít jako časně bioindikátory imunotoxicity. Jedním ze sledovaných bioindikátorů imunotoxicity je ovlivnění relativního počtu a struktury fagocytů (coelomocytů) po jejich stimulaci toxickou látkou. Pomocí těchto biomarkerů je zlepšována informovanost a sledování dopadu stopových kovů na organismy vyskytující se v půdním prostředí.

Jak již bylo zmíněno výše, běžně využívané organismy pro ekotoxikologické testy jsou kroužkovci, přičemž nejvíce využívaným testovaným organismem bývají zástupci žížal. Žížaly jako modelový organismus pro testování imunotoxicity v ekotoxikologických testech se osvědčily, protože to jsou hlavní dekompozitoři půdního prostředí. Žížaly jako kosmopolitní organismus byly také zvoleny dle jejich krátkého životního cyklu, délky a nenáročnosti pro laboratorní chov. Nejčastěji na žížalách byla testována léčiva (antibiotika) nebo těžké kovy, které jsou nejčastějšími kontaminanty půdního i vodního prostředí. V těle žížal se vyskytují imunokompetentní buňky (jinak také označovány jako coelomocyty), které mají mimo jiné schopnost fagocytózy. Ze zřejmých důvodů, a to možnost hodnotit dopad toxických látek na půdní a vodní organismy, byly vyvinuty postupy, jak získat dostatečné množství coelomocytů u žížal. Tyto studie se staly inspirací pro vlastní izolaci a kultivaci imunokompetentních buněk rouspice *Enchytraeus crypticus*. Postupy izolace však musely být optimalizovány pro menší organismus.

V této diplomové práci byl zvolen jako nejpříhodnější testovaný organismus roupice rodu *Enchytrasteus crypticus*. Práce s tímto organismem je pracovně i ekonomicky přívětivější než práce se žížalami. Roupice mají totiž kratší životní cyklus, takže testy prováděné na roupicích jsou i časově méně náročné oproti testům prováděným na žížalách. Roupice vyžadují také menší množství potravy a nejsou náročné pro laboratorní chov.

Tato diplomová práce by měla pomoci vyvinout postup, kterým budou buňky coelomu efektivně izolovány a poté použity pro vlastní *in vitro* testování imunotoxicity vybraných látek.

1 TEORETICKÁ ČÁST

Životní prostředí je každodenně znečišťováno řadou látek, proto je třeba hledat vhodné mikroorganismy, jednoduché organismy – například bezobratlé živočichy, pomocí nichž by bylo možné lépe monitorovat přítomnost látek, které poškozují nejenom životní prostředí, ale i všechny organismy. Jedním z možných bezobratlých organismů je žížala, ale jsou i jiné organismy – například roupice, jimž je věnována tato diplomová práce. V následujících odstavcích bude blíže popsána tato problematika a osvětlen princip ekotoxikologie, imunologie a citlivých ukazatelů toxicity pro půdní a vodní organismy. Dále bude popsána anatomická stavba kroužkoců včetně fungování jejich imunitního systému, a nakonec budou popsány již existující metody testování imunotoxicity.

1.1 Ekotoxikologie a citlivé ukazatele toxicity

Ekotoxikologie je obor, který se snaží odhalit rizika spojená s přítomností látek antropogenního charakteru v životním prostředí. Studuje vliv těchto látek na organismy, kromě člověka. Ke zhodnocení vlivu se používají mikroorganismy, rostliny, zvířata. Naopak tzv. klinická toxikologie zkoumá účinky takových látek pouze na jeden biologický druh, tzn. na člověka.

V rámci ekotoxikologického hodnocení se provádějí laboratorní testy neboli biotesty a chemická analýza vzorků. Ta slouží k detekci a kvantifikaci látek obsažených ve vzorku. U biotestů se zpravidla hodnotí reakce živých organismů na dané prostředí, na přítomnost sledované látky. Laboratorní biotesty spočívají ve vystavení modelových organismů studované látce za definovaných a kontrolovaných podmínek [1]. Biotesty jsou specifického i nespecifického charakteru. Zatímco nespecifické biotesty slouží k záchytu celkových toxických účinků všech látek, které jsou obsaženy v analyzovaných vzorcích, specifické biotesty jsou zaměřeny pouze na průkaz určitých toxických látek nebo stanovení konkrétních toxických účinků [1; 2]. Výsledky pak slouží ke hodnocení rizik, která jsou spojena s výskytem látek v životním prostředí. V závislosti na koncentraci látek, či době expozice lze dále rozlišovat dva hlavní druhy ekotoxicity, a to akutní a chronickou. Během testu je sledována odezva organismu, která může mít formu změny v chování, mortality, ale také formu jiných tzv. citlivých ukazatelů toxicity, mezi něž řadíme imunotoxické, genotoxické, biochemické a další změny. Zkoumané patologické jevy se v ekotoxikologii označují jako tzv. endpointy nebo biomarkery toxicity [3; 4].

Do skupiny citlivých ukazatelů toxicity řadíme jakékoliv změny, které nastanou po expozici xenobiotika a naznačují narušení homeostázy dávno předtím, než jsou u organismu pozorovány

změny na úrovni reprodukce, či přežívání. Na rozdíl od akutních účinků se tedy projevují již při působení nízkých koncentracích polutantů [4; 5].

Vědecká organizace US National Academy of Sciences Committee on Biological Markers vytvořila mezinárodně uznávané dělení biomarkerů. Rozlišujeme tři typy biomarkerů [3; 6]:

- Expozice
- Účinku a odpovědi
- Citlivosti

Biomarkery expozice pomáhají určit o jakou látku se jedná, včetně jejího množství a koncentrace. Biomarkery účinku a odpovědi se zabývají mechanismem účinku toxických látek a výslednou reakcí organismu na danou látku, popřípadě látky. A jako poslední se rozlišuje biomarker citlivosti, který stanoví, do jaké míry je sledovaný organismus citlivý na studovanou látku [5; 6].

Mezi citlivé ukazatele toxicity se řadí tyto „endpointy“ testů:

- Oxidativní stres
- Genotoxicita
- Teratogenita
- Imunotoxicita

1.1.1 Oxidativní stres

Oxidativní stres je považován za biomarker s největší vypovídací hodnotou ze všech popisovaných dějů. Je pozorován při narušení vnitřní rovnováhy organismu. Vnitřní rovnováha je narušována vznikem většího množství silně reaktivních volných radikálů, než je systém schopen zachytit. Za normálních podmínek je rovnováha zajištěna antioxidačními mechanismy, které mají za úkol vychytat jednotlivé volné radikály [7]. Antioxidační mechanismy jsou dvojího typu, a to enzymatické nebo neenzymatické. Mezi enzymy, které destruuji volné radikály, řadíme superoxid dismutázu, glutathion reduktázu, katalázu a další. Tyto enzymy, obzvlášť jejich hladinu a aktivitu, označujeme jako biomarkery oxidativního stresu. Do neenzymatických antioxidačních mechanismů jsou řazeny látky přijímané v potravě jako je kyselina citronová, beta-karoten, a látky vytvářené v organismu, do něž patří redukovaná forma glutathionu, popřípadě kyselina močová. Oxidativní stres je příčinou řady patologických změn uvnitř organismu, nejčastěji však volné radikály poškozují DNA, či způsobují peroxidaci bílkovin a tuků [8; 9]. Jako příklad pro detekci oxidačního stresu v ekotoxikologii je používáno stanovení superoxid dismutázy (SOD) nebo malondialdehydu (MDA). SOD Společně s katalázou a peroxidázou tak hrají ochranou a nezastupitelnou roli v obraně organismu před

toxickými superoxidovými radikály a peroxidem vodíku, a tím je zvyšována antioxidační aktivita [10]. Ke stanovení SOD je využívána metoda kapalinové chromatografie, ELISA test nebo metoda nepřímá, která detekuje aktivitu superoxidodismutázy. Její aktivita je zajištěna schopností SOD inhibovat reakce, jež jsou řízené superoxidy [11]. Tato metoda probíhá ve třech krocích [12; 13]:

- Produkce superoxidů
- Detekce superoxidů
- Inhibice reakcí řízených superoxidy

Produkce superoxidů je zajištěna reakcí xantinu s xantin oxygenázou nebo nikotinamidadenindinukleotidem/nikotinamidadenindinukleotidfosfátem (NADH/NADPH) s fenazin methosulfátem. Dále je potřeba superoxidy umět detekovat – k tomu slouží specifické detektory, jako je cytochrom c, nitrobluetetrazolium (NBT), pyrogallol a jiné chromogenní substráty. Tyto substráty by měly po reakci se superoxidy vytvářet barevné produkty, které jsou spektrometricky změřitelné. Poslední zmíněnou metodou je inhibice reakcí řízených superoxidy, kdy superoxidodismutáza má schopnost reakce se superoxidy. Díky této schopnosti SOD dochází k inhibici reakce přeměny z chromogenních substrátů na jejich specifické barevné produkty [14; 13].

1.1.2 Genotoxicita

Genotoxicita, také označovaná jako mutageneze, je děj, při němž dochází k poškození DNA vlivem působení mutagenních faktorů, dále jen mutagenů. Rozlišují se tři druhy mutagenů [15; 16]:

- Fyzikální
- Chemické
- Biologické

Mezi fyzikální mutageny patří hlavně UV a ionizační záření. Do chemických mutagenů spadají mutace zapříčiněné chemickou modifikací jednotlivých nukleotidů a změnami polynukleotidového řetězce. Chemické mutageny rovněž mohou vyvolat mutace genové, chromozomové, genomové a gametické. Mezi biologické mutageny řadíme viry a transpozony [15; 17]. Jako příklad pro stanovení genotoxicity v ekotoxikologii se používá například Amesův test nebo micronucleus test (mikronukleární test) [18]. Amesův test se používá jako screeningový test pro detekci reverzních mutací v histidinovém lokusu v buňkách *Salmonella typhimurium*, jež jsou geneticky modifikovány. Při reverzní mutaci dochází

k přeměně histidin-auxotrofních (His-) buněk na histidin-prototrofní (His+). Buňky His+ jsou pak schopné růst v médiu i za nepřítomnosti aminokyseliny histidinu. Jestliže je detekovatelná obnova růstu a metabolická aktivita, test poukazuje na genotoxické účinky daného vzorku [18; 19].

1.1.3 Teratogenita

Teratogenita je stav, který za účinku vnějších faktorů, teratogenů, podněcuje i zvyšuje riziko vzniku vrozených vývojových vad. Rozlišujeme tři druhy teratogenů [20]:

- Biologické
- Chemické
- Fyzikální

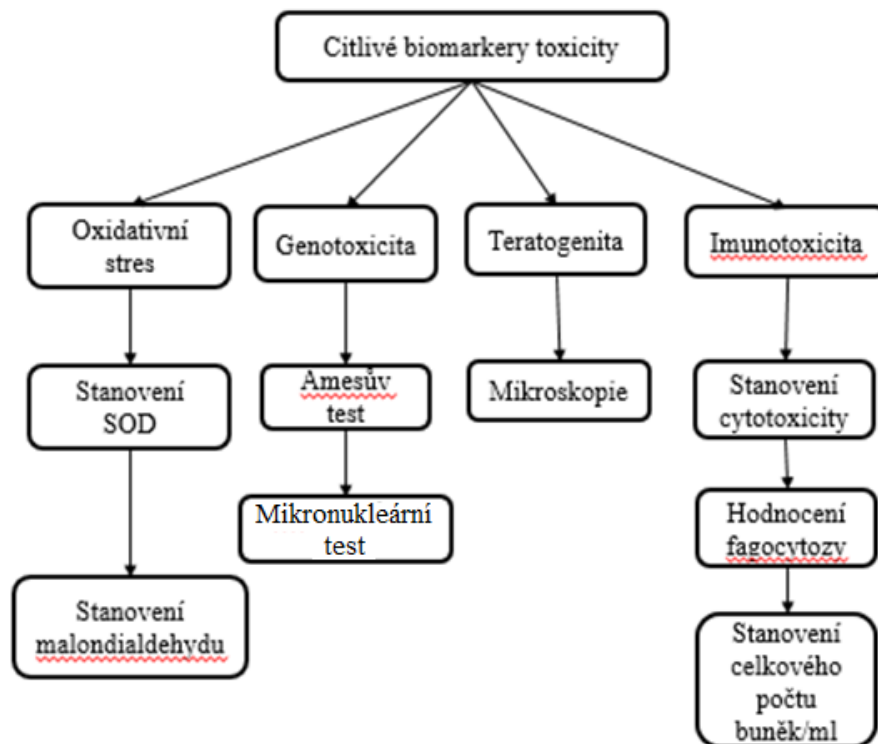
Do teratogenů biologické povahy spadají různí původci infekčních onemocnění. Například cytomegalovirus, herpesviry, treponema pallidum, toxoplasma gondii aj [21]. Teratogeny chemické povahy zahrnují látky, jenž se využívají v průmyslu nebo zemědělství. Patří sem organická rozpouštědla, těžké kovy, různá léčiva, cytostatika, antibiotika, antiepileptika, thalidomid, alkohol, drogy a jiné [22; 23]. Mezi teratogeny fyzikální povahy jsou řazeny různé typy ionizujícího záření, vysoká teplota či mechanické teratogeny [24; 20]. Pro hodnocení teratogenity se využívá například mikroskopická detekce vrozených vývojových vad s morfologickými, imunocytochemickými a histochemickými technikami [25]. Například v jedné studii detekovali teratogenní účinky metronidazolu na myší plod pomocí FTIR mikroskopie. Jedná se o infračervenou spektroskopii s Fourierovou transformací, která je vhodná pro biodiagnostiku. V této studii zjistili, že Metronidazol jakožto lék, jenž se běžně využívá při léčbě trichomonázy nebo bakteriální vaginózy, způsobuje změnu v chemickém složení skupin jaterních a mozkových biomolekul myších plodů [26].

1.1.4 Imunotoxicita

Imunotoxicita látek je popisována jako schopnost látek ovlivňovat fungování imunitního systému tak, že působí na některou ze složek imunitního systému. Tím zapříčiní oslabení organismu, popřípadě vznik imunopatologických reakcí - tato problematika bude popsána v samostatné kapitole [27]. Mezi příklady metod hodnocení imunotoxického účinku v ekotoxikologii patří metoda stanovení cytotoxicity, hodnocení fagocytózy, popřípadě hodnocení populací imunokompetentních buněk [28]. Například v jedné publikaci od autorů Shen a kol. uvádí, že extrakt z květu sinic, tzv. CBE, obsahující microcystin je vysoce

imunotoxický pro testovaný myší organismus. Tento extrakt způsobuje celkovou imunosupresi a pokles fagocytózy, která byla hodnocena pomocí fagocytárního indexu peritoneálního fagocytu. Při pokusu léčby pomocí CBE byla zjištěna indukovaná lymfoproliferace čili snížení počtu buněk, jež tvoří protilátky. K indukované lymfoproliferaci dochází v důsledku inhibice lipopolysacharidu [29]. Dalším příkladem je cytotoxicita. Jedná se o cokoliv, co je pro buňky toxické a mění jejich tvar, životnost a funkce. Je sledována za pomoci průtokového cytometru, fluorescenčních analýz nebo příjmu neutrální červeně [30]. V jedné z publikací se autoři Zhisong Cui a kol. zabývali stanovením cytotoxicity v mořské vodě, která byla kontaminovaná těžkými kovy, pomocí bakteriálního celobuněčného biosenzoru s názvem *Acinetobacter baylyi* Tox2. Test byl založen na detekci různých koncentrací toxických látek, které byly přímo úměrné intenzitě bioluminiscence [31]. Jelikož imunotoxicita je ústředním tématem této práce, budou metody testování imunotoxicity pro obratlovce i bezobratlé dále rozebrány podrobněji v samostatných kapitolách.

Pro shrnutí obsáhlé problematiky testování citlivých biomarkerů toxicity v ekotoxikologii je na Obrázku č. 1 uvedeno schéma.

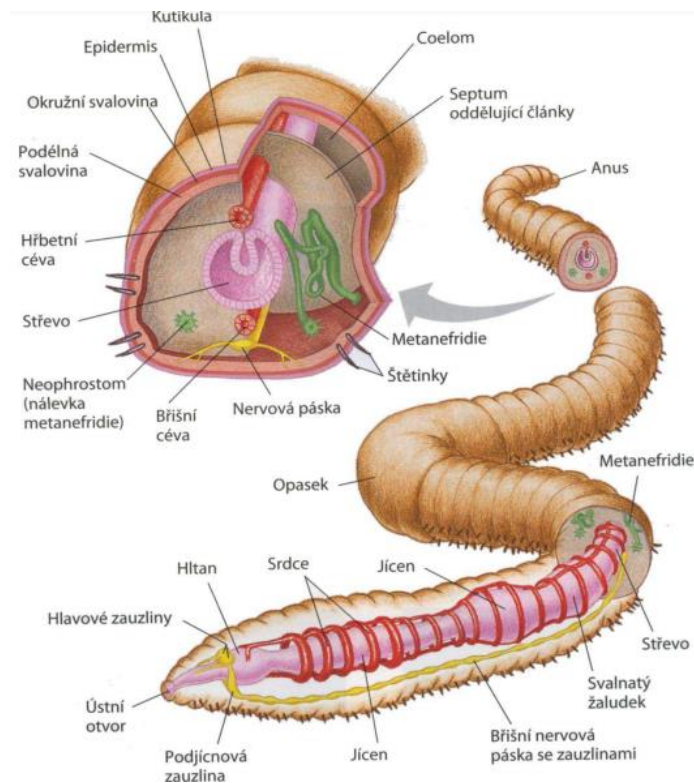


Obrázek 1 - Vybrané příklady biomarkerů toxicity látek využitelných v ekotoxikologii, vlastní zdroj.

1.2 Kroužkovci (*Annelida*)

Kroužkovci jsou bezobratlí živočichové. Jejich tělo je protáhlé, článkované z vnitřku i zvnějšku (takovýto stav označujeme jako homogenní segmentace) a jejich velikost závisí na druhu kroužkovce. Mezi jednotlivými články lze pozorovat vnitřní přepážky, které se označují jako „dissepimenty“. Každý článek se skládá z pokožky, svalů a coelomových dutinek. Jelikož kroužkovci nemají končetiny, je zapotřebí většího vývinu svalů, ať již příčných či okružních pro lepší pohyb. K pohybu také přispívají malé štětinky [32]. Rozlišujeme dvě třídy kroužkovců, a to opaskovce a mnohoštětinatce. Opaskovci jsou zejména sladkovodní či suchozemští živočichové. Dělí se dále na máloštětinatce a pijavky. Do této skupiny je zařazena například žížala obecná, žížalice a nebo roupice, na něž je zaměřena má práce. Tělo opaskovců je tvořeno výrazným opaskem. Ten slouží pro tvorbu slizového pouzdra, respektive kokonu pro vajíčka. Opaskovci jsou hermafrodité [33]. Zatímco mnohoštětinatci jsou spíše mořští živočichové, nejsou hermafrodité a jsou více vyvinutí [34; 35].

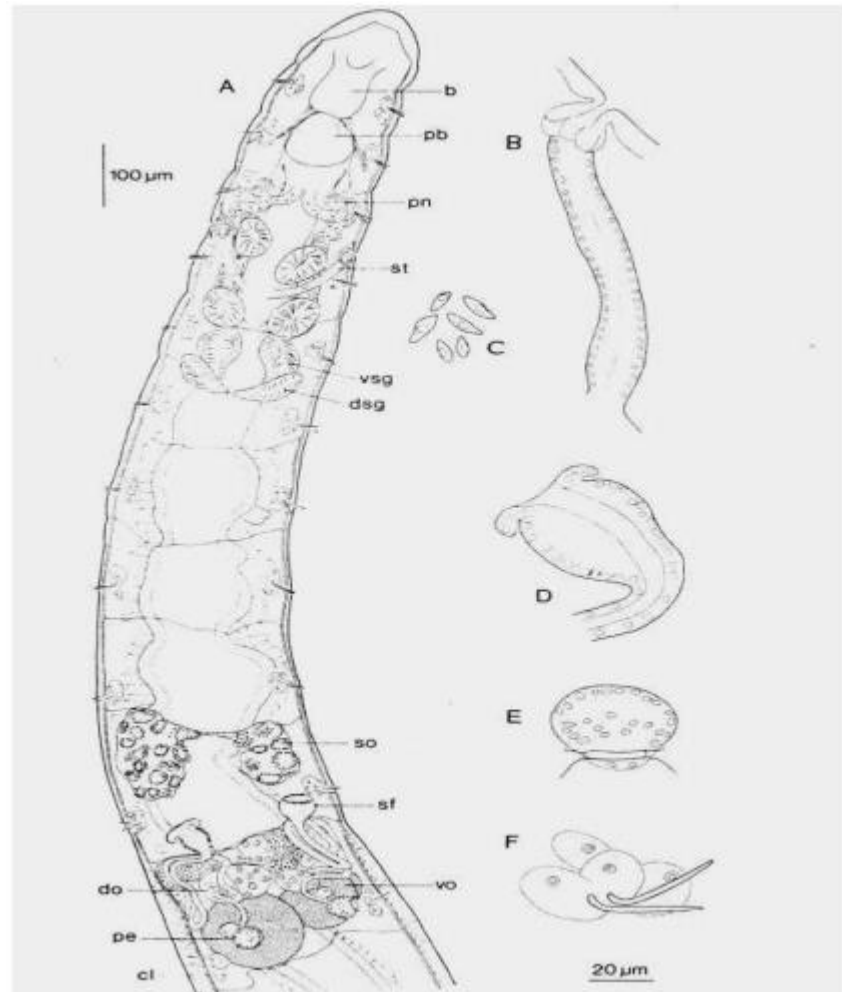
Kroužkovci mají v ekotoxikologii nezastupitelnou funkci. Využívají se například v určení míry nebezpečnosti látek, které jsou součástí půdy, pro ekosystémy [34].



Obrázek 2 - Stavba těla žížaly, převzato z [36].

1.2.1 Roupice *Enchytraeus crypticus*

Roupice rodu *Enchytraeus crypticus* je bělavý červ o velikosti od 3 do 12 mm. Její tělo je článkované a opatřeno opaskem. Ten se nachází obvykle v přední třetině těla roupice. Opasek neboli *clitellum* v době páření vylučuje sliz. Ten slouží k obalení nakladených vajíček – tvorba kokonu a zároveň napomáhají přenosu spermií. Proto jsou roupice řazeny mezi opaskovce [37]. Díky tomuto výraznému opasku lze pouhým okem zhodnotit, zda se jedná o dospělého jedince či nikoliv. Dospělí jedinci tento opasek mají zcela vytvořený. Roupice rodu *E. crypticus* byla zvolena jako modelový organismus díky své malé velikosti, rychlosti rozmnožování a snadnému chovu [38]. V testech se běžně používá okolo 10 až 20 jedinců na testovací nádobu. Lze samozřejmě použít i více jedinců (např. pro získání většího množství biomasy pro následnou analýzu). Vyšší počet jedinců také zaručuje statisticky reprezentativnější výsledky. Rozmnožovací schopnost roupic je velmi rychlá a trvá zhruba 17 dnů. Další výhodou *E. crypticus* je jejich nízká náročnost na chov. V laboratorních podmínkách jsou roupice *E. crypticus* chovány při teplotě (20 ± 1) °C v termoboxu ve tmě. Součástí chovu musí být neutrální až mírně kyselé pH, mírná vlhkost a přístup kyslíku [39]. Za takovýchto podmínek se po oplození vyvíjí až 30 červů z jednoho kokonu. Tento vývoj trvá okolo 9 dnů. Po vylíhnutí červi dosahují délky přibližně 1 mm. Při stejných podmínkách dochází k pohlavnímu vývoji, který trvá přibližně 8 dnů. Po této době vznikají dospělí jedinci, kteří již mají svůj vlastní opasek a cyklus se může opakovat. Roupice se dožívají okolo 85 dnů [34; 40]. Tělní stavba roupice *E. crypticus* je zobrazen na Obrázku č. 3.



Obrázek 3 - Tělní stavba roupice *Enchatriaeus crypticus*, kde A: je dorsoventrální pohled na přední část těla; B: spermatéka; C: coelomové buňky; D: semenná nálevka; E: semenná žláza; F: štětiny s váčkovitými buňkami; b: mozek; cl: opasek; do: vyvíjející se vajíčka; dsg: dorsální lalok třetího páru septálních žláz; pb: hltanový váček; pe: semenný váček; pn: peptonefridium; sf: semenná nálevka; st: spermatéka; so: semenný váček; vo: vitelogenní vajíčko; vsg: ventrální lalok třetího páru septálních žláz [41].

Mezi další standardní modelové organismy náleží i žížaly, které jsou fyziologicky velmi podobné roupicím, a většina studií v dostupné literatuře byla provedena na nich. Proto lze využít jako zdroj informací pro předloženou diplomovou práci studie využívající jako testovací organismus žížaly a podobné kroužkovce.

1.3 Imunitní systém člověka a kroužkovců

1.3.1 Imunitní systém člověka

Imunitní systém hraje svou roli v ochraně vnějšího i vnitřního organismu a rozdělujeme jej na dvě složky, a to na složku vrozenou a získanou. Imunitní systém se skládá z lymfatického systému (slezina, lymfatické uzliny, Peyrovy plaky) a bílých krvinek (leukocyty). Jako takový chrání organismus před parazity, cizorodými molekulami, nádorovými buňkami a mikroorganismy [42].

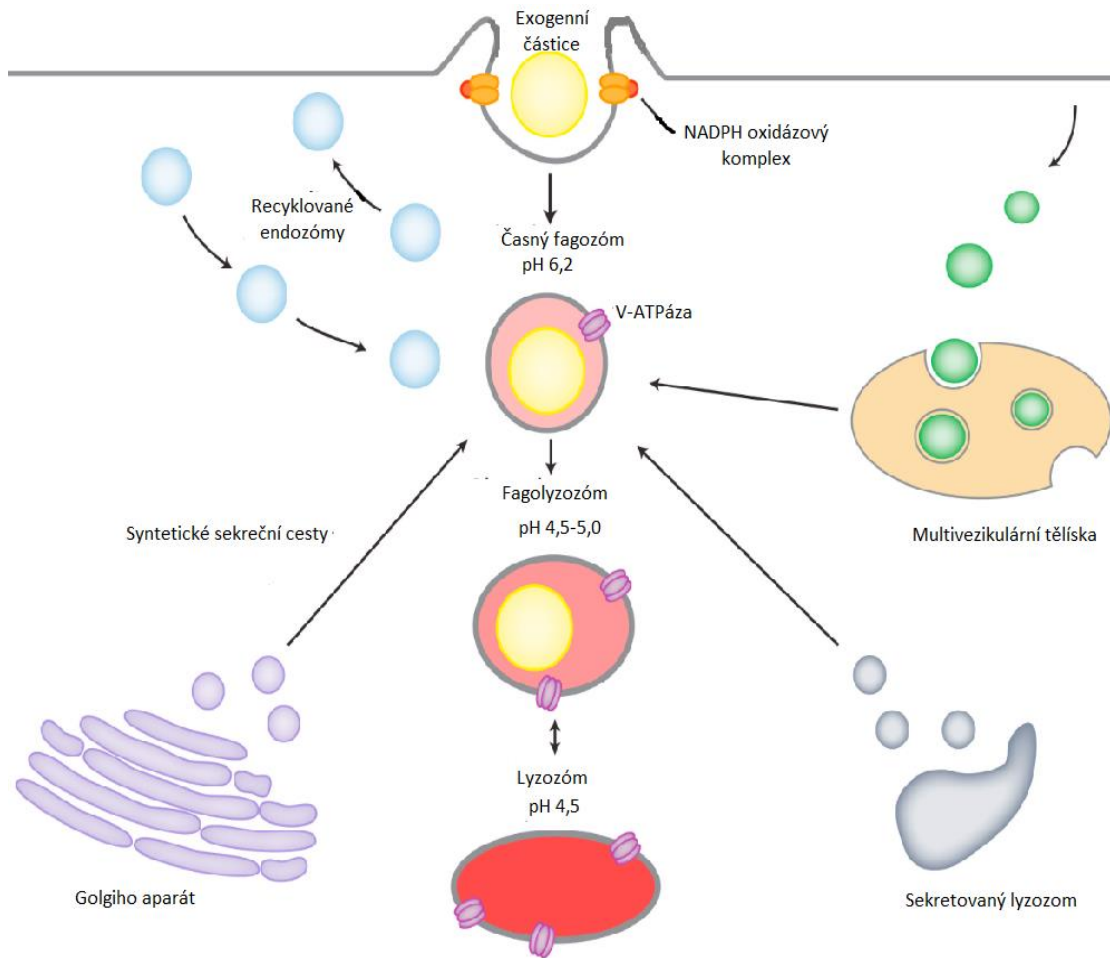
1.3.2 Základní složky imunitního systému člověka

Přirozený imunitní systém

Přirozená složka imunitního systému může být dále označována jako neadaptivní, nespecifický, popřípadě vrozený imunitní systém. Charakteristickým pro tuto složku je skutečnost, že všechny potřebné informace jsou zapsány v DNA. Tento typ imunity je připraven zareagovat při každém střetu s cizorodým antigenem, a to velmi pohotově (pár minut až hodin). Avšak má i své úskalí, jednak nemá paměť a nereaguje proti specifickým antigenům a jednak je vývojově mnohem starší [43]. Vrozený imunitní systém je tvořen složkami komplementu a fagocyty (granulocyty a makrofágy). Svými specifickými receptory rozeznává mnohé chemické struktury, které jsou charakteristické pro dané mikroorganismy. Dále je možné pozorovat určité anatomické bariéry jako je kůže, sliznice či mukózní membrány. Patří sem i fyziologické bariéry, do kterých řadíme hodnotu pH, jenž je specifická pro jednotlivé části těla, a teplotu. Nesmíme opomenout schopnost tvořit fagocytární bariéry, s nimiž souvisí zánětové bariéry [42; 43]. Ty jsou součástí procesu zvaný fagocytóza. Jedná se o evolučně velmi starou formu obranného mechanismu. Funguje na bázi endocytózy, kdy rozpadlé buňky či mikroorganismy jsou specificky pohlceny do endocytického váčku neboli fagozomu. Celý proces probíhá v několika krocích, kdy nejdříve dochází k adhezi na povrch cizorodé částice, její pohlcení a vytvoření fagozomu a k následné destrukci pohlcené částice. Hlavním úkolem fagocytů je ochrana hostitele před šířením a popřípadě růstu infekčních částic. Nachází se u bezobratlých i obratlovců. Mezi jednotlivé kroky fagocytózy patří [44; 45; 46]:

- Chemotaxe (řídí pomocí chemokinů migraci fagocytů do místa zranění)
- Adheze (pomocí opsoninů fagocyty adherují na patogen)
- Pohlcení (neboli ingesce, dochází k tvorbě fagozomu za pomoci pseudopodií)
- Usmrcení (vznik fagolysozomu, probíhá degradace patogenu)

Shrnutí jednotlivých fází fagocytózy je zobrazeno na Obrázku č. 4.



Obrázek 4 – Jednotlivé fáze fagocytózy, obrázek převzat a upraven z Russell a kol., 2011 [45; 47].

Specifický imunitní systém

Specifická složka imunitního systému může být dále označována jako do adaptivní, specifický, popřípadě získaný imunitní systém. Tato složka je vývojově mnohem mladší. U specifické složky je rozlišována buněčná a humorální složka. Zatímco buněčná složka je tvořena T lymfocyty, humorální složka B lymfocyty a plazmatickými buňkami [42]. Každý z klonů B- a T- lymfocytů nese své unikátní receptory. Obranschopnost se vyvíjí postupně, a to až po setkání tzv. imunizaci s daným patogenem. Specifická imunitní odpověď je schopna si tvořit imunologickou paměť již při prvním setkání s patogenem. Díky tomuto mechanismu pak organismus při dalším kontaktu se stejným patogenem reaguje pohotově [48]. Specifická imunitní odpověď je pak založena na vazbě antigenu na specifický receptor. Jak již bylo

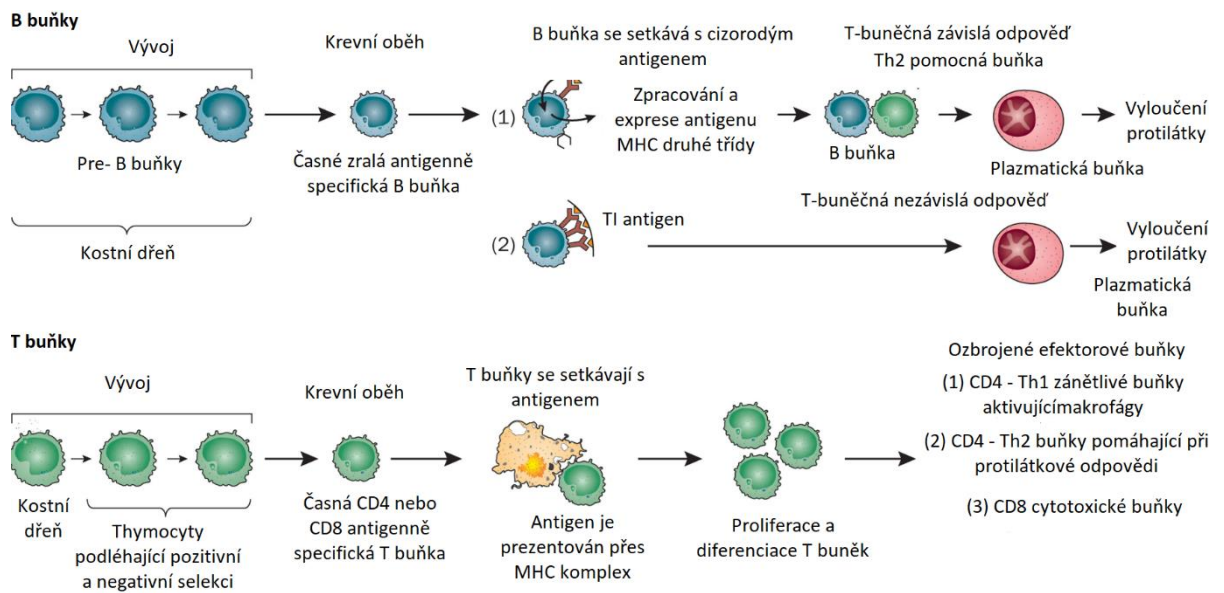
zmíněno výše, specifická imunitní odpověď se skládá z buněčné a humorální složky. Buněčná složka je tvořena T lymfocyty, které dozrávají z kmenových buněk v brzlíku (Thymu). Ten je řazen mezi primární lymfatické orgány a byť brzlík v dospělosti zaniká, T lymfocyty se zde vyvíjí po celý život. Humorální složka je tvořena B lymfocyty, jež vznikají a zároveň dozrávají v kostní dřeni, a plazmatickými buňkami [42; 43; 48].

Rozlišujeme různé druhy T lymfocytů, a to dle jejich funkce [44; 49]:

- T cytotoxické buňky (Tc lymfocyty, specificky rozpoznávají pomocí svých receptorů cizorodé antigeny buněk)
- T pomocné buňky (Th, Th1 stimulují buněčnou imunitu, Th2 stimulují humorální imunitu)
- T tlumivé buňky (T supresorové lymfocyty, regulují činnost T a B lymfocytů)

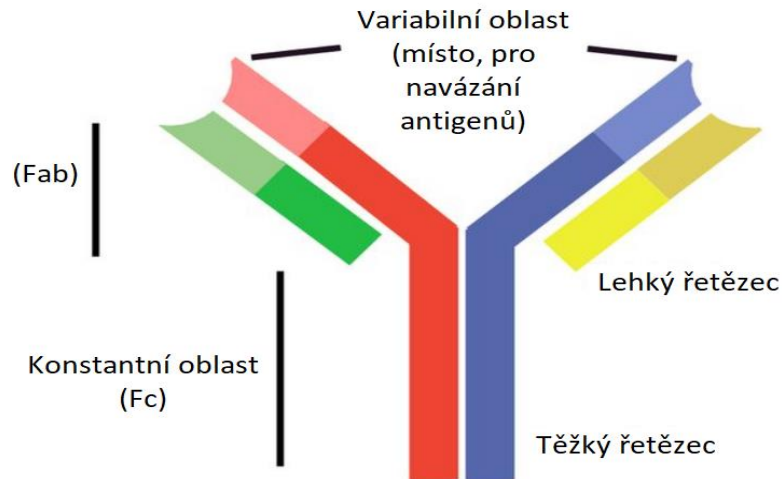
Humorální složka je naopak tvořena B lymfocyty, cytokiny a plazmatickými buňkami, jež jsou odpovědné za protilátkovou odpověď. B lymfocyty vznikají v kostní dřeni, kde také dozrávají a z ní jsou následně uvolňovány do krve, z níž putují do sekundárních lymfatických orgánů (slezina, Peyrovy plaky, lymfatické uzliny) [48]. U zralého B lymfocytu je možné na jeho povrchu pozorovat molekuly imunoglobulinu, které fungují jako specifický receptor pro antigen. K přeměně z nezralého B lymfocytu na zralý dochází až při styku s antigenem a k jeho aktivaci dopomáhá již zmíněný Th2 lymfocyt. Po takovéto aktivaci se vytváří nové klony lymfocytů, kdy část z nich se přemění na paměťové B lymfocyty a několik z nich dozrává až v plazmatické buňky, jež produkují protilátky [42; 44; 49].

Shrnutí významu T a B lymfocytů v adaptivní složce imunitního systému je znázorněno na Obrázku č. 5.



Obrázek 5 - Role T a B lymfocytů ve specifické imunitní odpovědi, převzato a upraveno z [42].

Protilátky neboli imunoglobuliny jsou základem humorální imunitní odpovědi. Jsou dvojího charakteru - buď jsou volně kolující v krvi vytvořené plazmatickými buňkami schopnými vázat se specificky na antigen, nebo jsou vázány na povrchu membrány B lymfocytů a slouží jako receptor pro antigen [50]. Pro správné pochopení jejich podstaty věci, je zapotřebí jejich popis. Základní stavební jednotkou imunoglobulinů jsou čtyři řetězce. Dva z nich jsou lehké a další dva jsou těžké řetězce [51]. Jednotlivé řetězce jsou spojeny nekovalentními hydrofobními silami a zároveň se zde uplatňují disulfidické můstky, které dávají výsledný tvar protilátek v podobě Y [50; 52]. Struktura protilátky třídy IgG je znázorněna na Obrázku č. 6.






Obrázek 6 - Struktura protilátky IgG, která je tvořena ze dvou identických těžkých (červená a modrá) a dvou identických lehkých (žlutá a zelená) řetězců. Horní část (Fab) je složena ze dvou variabilních oblastí a každá váže stejný antigen. Spodní oblast (Fc) interaguje s buněčnými receptory či komplementem. Obrázek byl převzán a upraven z [49].

Dále je možné rozeznat podle typů těžkých řetězců až 5 tříd imunoglobulinů [44; 51; 52; 53]:

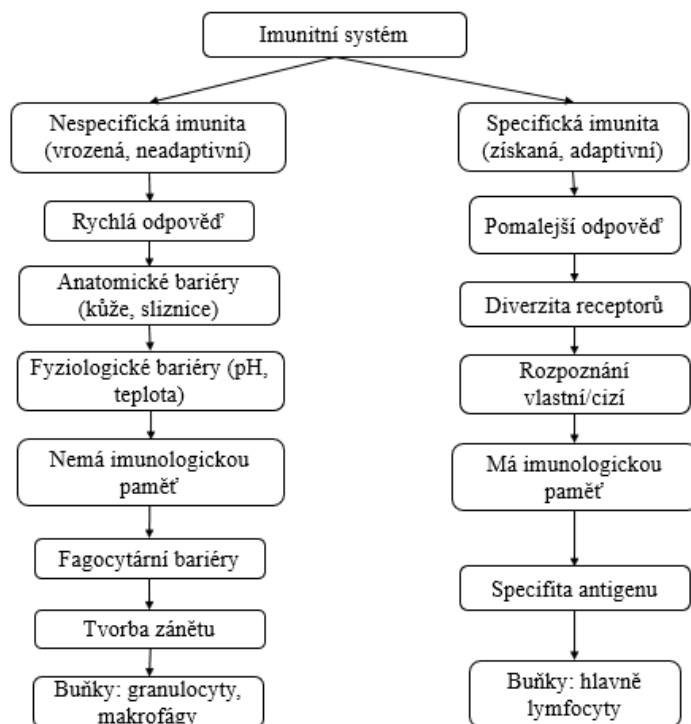
- IgG (neutralizuje toxiny, viry, aktivuje komplement a usnadňuje fagocytózu. Je přenášen transplacentárně)
- IgM (aktivuje komplement klasickou cestou, objevuje se v ranných fázích obranyschopnosti)
- IgA (monomer – v krevní plazmě; dimer – v sekretech sliznic)
- IgE (vyskytuje se u alergických stavů)
- IgD (součástí povrchu membrány B lymfocytů)

Přehled jednotlivých funkcí a typů protilátek je znázorněn na Obrázku č. 7.

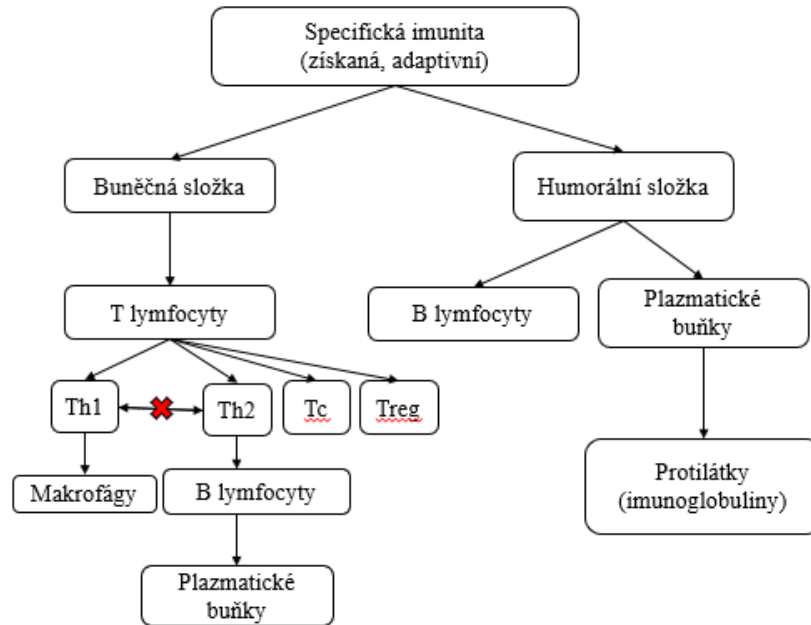
Hlavní protilátkový izotyp	Sekretovaná forma		Funkce
IgD	Žádná		Časný B - buněčný receptor
IgM	Pentamer		Časný B - buněčný receptor, přirozená protilátka, aktivuje komplement
IgG	Monomer		Oponizace, aktivuje komplement, novorozenecká imunita
IgE	Většinou navázaný na buňkách		Obrana proti parazitům, alergie
IgA	Dimer, vylučován na povrch sliznic		Slizniční imunita

Obrázek 7 - Pět hlavních izotypů protilátek a jejich funkce v imunitní odpovědi, obrázek byl upraven a převzat z [49].

Pro shrnutí obsáhlé problematiky rozdělení imunitního systému je uvedeno schéma na Obrázku č. 2. a další schéma rozlišení specifické imunity na Obrázku č. 8.



Obrázek 8 - Základní rozdělení imunitního systému, vlastní zdroj.



Obrázek 9 - Souhrnné rozdělení specifické imunitní odpovědi, vlastní zdroj.

1.3.3 Imunitní systém kroužkovců

Kroužkovci jsou bezobratlí živočichové, tudíž jejich systém je na rozdíl od člověka tvořen pouze vrozeným imunitním systémem. Je tomu tak proto, že jejich těla nejsou natolik vyvinutá, avšak oproti jiným živočichům mají kroužkovci vyšší schopnost regenerace [32]. Jak již bylo zmíněno, přirozená imunita je tvořena buněčnou imunitou a ochrannými mechanismy. U buněčné imunity rozeznáváme specifické buňky zvané coelomocyty, což jsou krevní buňky. Nachází se pouze v coelomu, to je tělní dutina vyplněna tekutinou. Tato coelomická tekutina je důležitá pro fyziologické fungování kroužkovců. Účastní se transportu živin, dýchacích plynů, signálních molekul, přenosu meziproductů či konečných produktů [54]. Coelomocyty se v coelomu mohou volně pohybovat a tím zajišťují rovnováhu imunitního systému. Jak již bylo naznačeno, coelomocyty zajišťují buněčnou imunitní odpověď ve formě fagocytózy, nodulaci, zánětlivých reakcí, tak i v nesprávně označované humorální imunitní odpovědi, v níž dochází k produkci převážně enzymu – lysozym, peroxidázy [55]. Na rozdíl od člověka buněčnou imunitu zajišťují granulocyty a makrofágy a humorální složky T a B lymfocyty [49].

Rozlišujeme tři druhy coelomocytů:

- Améboocyty
- Eleocyty
- Granulocyty

Améboocyty tvoří většinu coelomocytů, mají oválná, popřípadě ledvinovitá jádra. Existují náznaky, že améboocyty pocházejí z výstelky coelomu. Na svém povrchu mají četné panožky

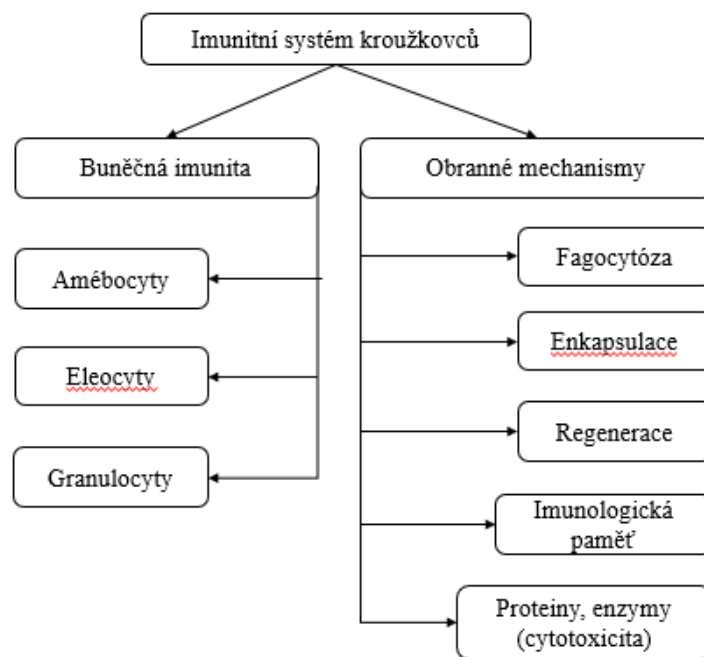
neboli pseudopodia, díky nimž mají svou schopnost fagocytózy. Princip fagocytózy byl popsán výše. Kromě toho se podílejí na hojení ran, srážení, tvorbě granulomu, koagulaci coelomické tekutiny, enkapsulaci, cytotoxicitě zánětu aj [56]. Jsou rozlišovány dva typy amébocytů – a to hyalinní a granulární. Hyalinní amébocyty jsou ve světelném i elektronovém mikroskopu pozorovány jako buňky bez zřetelných granulí a se vzácnými organelami. Za to granulární amébocyty obsahují hojné množství granulí, především v perinukleární oblasti. Často jsou tak vnímána jako denzní tělíška. Dalším typem coelomocytů jsou granulocyty. Ty jsou oproti amébocytům mnohem větší a jejich jádra mají kulovitý a acidofilní charakter [54]. Posledním typem coelomocytů jsou eleocyty, které jsou největší ze všech tří typů krevních buněk. Často se označují také jako chloragocyty. Tento název je odvozen od diferenciacce buněk z chloragogenu, jenž pokrývá coelomické povrchy trávicího traktu a hlavních krevních cév. Mají kulovitý, někdy až oválný tvar a malá kulovitá granula, chloragosomy [57]. Eleocyty jsou výjimečné tím, že mají schopnost ukládat endogenní materiály, jako je glykogen, lipidy a riboflavin. Právě díky riboflavinu je u eleocytů pozorovaná autofluorescence. [58]. Eleocyty se mimo jiné podílejí na rovnováze iontů a pH coelomické tekutiny. Dále se podílejí na detoxikaci tkání žířal a akumulaci těžkých kovů [56]. Morfologické shrnutí jednotlivých typů buněk je naznačeno v Tabulce č. 1.

Tabulka 1 - Morfologická charakteristika coelomocytů, tabulka převzata a upravena z [57].

Typ coelomocytu	Velikost (μm)	Tvar buňky	Organely v buňce	Pseudopodia
Eleocyt	17,7	Sférický	Chloragosomy	Vzácně málo lobopodií
Amébocyt I (granulární)	11,2	Oválné nebo konkávní	Několik lysozomů, vakuol, vezikul	Málo lobopodií
Amébocyt II (hyalinní)	27,0	Ve tvaru fazole	Málo vezikul, volné ribozomy, lysozomy, mikrotubuly, fagozomy, mitochondrie	Četné filopodie
Granulocyt	18,0	Ovál	Volné ribozomy, lysozomy, četná granula	-

Buněčná imunita je doplněna o obranné mechanismy. Nejznámější je fagocytóza, dále enkapsulace. Nejlepšími fagocyty jsou však amébocyty, díky jejich schopnosti měnit tvar a panožkám, které jsou součástí jejich povrchu [54]. Makrofágy se dají považovat za takové amébocyty u člověka [46]. Enkapsulace je proces, který funguje na stejné bázi jako fagocytóza, ovšem rozdíl spočívá v tom, že při fagocytóze jsou pohlcovány látky menšího

charakteru. Naopak při enkapsulaci jsou pohlcovány látky většího rozměru, kdy cizorodé látky či poškozené buňky jsou obklopeny coelomocyty a dojde k vytvoření váčku. Obsah váčku je pak degradován pomocí cytotoxických látek produkovaných především amébocyty či granulocyty [59; 60]. Dalším obranným mechanismem je schopnost regenerace, která úzce souvisí s předešlými mechanismy. Nedílnou součástí je i imunologická paměť, která se u kroužkoců označuje jako imunitní „priming“. Jedná se o takový proces, během něhož organismus zpracovává veškeré vjemy a zabudovává si je do paměti. Tím posiluje imunitní odpověď při dalších expozicích [58; 61]. Na následujícím Obrázku č. 10. je znázorněno shrnutí imunitního systému kroužkoců.



Obrázek 10 - Souhrnné znázornění složek imunitního systému kroužkoců, vlastní zdroj.

Rozdíl mezi imunitním systémem člověka a kroužkoců je především ve fylogenezi. Imunitní systém kroužkoců je náchylný a lehce ovlivnitelný různými látkami včetně těch toxických. Proto je možné využívat kroužkovce jako modelové organismy pro testování imunotoxicity.

1.4 Testy imunotoxicity u člověka a kroužkoců

1.4.1 Metody testování imunotoxicity u člověka

Imunotoxicitu testujeme dvěma možnými způsoby, a to buď pomocí buněčných *in vitro* testů nebo testů prováděných na zvířatech (*in vivo* testy).

In vitro metody hodnocení imunotoxicity

In vitro testy jsou přínosné k detekci imunotoxicity vzhledem k nižším etickým obavám, snadným kultivačním metodám, krátkým růstovým cyklům a nižším pracovním a finančním nákladům [62]. V následujících odstavcích budou popsány buněčné imunotesty, jenž se využívají k detekci imunotoxicity látek znečišťující životní prostředí. Pro *in vitro* metody je zapotřebí vybrat vždy vhodné buněčné linie dle typu testu [63]. V Tabulce č. 2. si dovolím vypsát výběr běžně používaných buněčných linií a jejich buněčné kultivační postupy používané v imunotoxických metodách. Tento výběr je inspirován z přehledového článku, ve kterém se věnovali problematice *in vitro* testování imunotoxicity.

Tabulka 2 - Výběr buněčných linií používaných v *in vitro* metodách, Tabulka převzata z [63].

Typ buňky	Buněčná linie	Druh	Stav kultury
Makrofág odvozený z monocytů	THP-1	Člověk	Střední: RPMI 1640 s 10 % FBS; Diferenciace: 5–123,4 ng/ml forbol 12-myristát 13-acetátu (PMA) po dobu 24–72 hodin, následuje 24–48 hodinová inkubace v neošetřeném buněčném kultivačním médiu
T lymfocyt	Jurkat	Člověk	Médium: RPMI 1640 s 10 % FBS, 10 mM HEPES, 10–100 U/ml penicilinu, 100 µg/ml streptomycinu
B lymfocyt	Ramos	Člověk	Médium: RPMI 1640 s 10 % FBS, 10 U/ml penicilinu, 100 µg/ml streptomycinu, 10 mM HEPES
NK buňka	NKL	Člověk	Střední: RPMI 1640 s 10 % tepelně inaktivovaným FCS a 100 U/ml IL-2

Identifikace imunotoxicity vyvolaná látkami znečišťující životní prostředí se provádí především těmito typy stanovení [63]:

- Apikálních koncových bodů buněk
- Indikátorů oxidačního stresu
- Imunitní dysfunkce

Metoda stanovení apikálních koncových bodů využívá hodnocení životaschopnosti buněk a jejich schopnost apoptózy. Testy jsou založené na redukční reakci indukované dehydrogenázou v živých buňkách, jako jsou testy MTT a CCK-8, ty jsou široce využívány

v imunitních buňkách (makrofágy, lymfocyty a dendritické buňky) [62]. Apoptózu stanovujeme například za pomoci barvení Annexin-V či propidium jodidu, popřípadě měření úrovně exprese genů či proteinů, jenž s apoptózou souvisí (například p53 a bcl-2). Proces apoptózy se musí monitorovat v reálném čase k tomu slouží annexin-V-infračervený fluoroforový konjugát (Q-annexin V), čímž se může detekovat kinetika apoptózy ve 2D a 3D buněčných kultivačních systémech [64]. Tato sonda dokáže rychle rozpoznat změněnou proteinovou strukturu během apoptózy a tím i dochází k přepínání mezi zhasením a fluorescencí [63].

Metoda stanovení indikátorů oxidačního stresu zkoumá hladinu reaktivních forem kyslíku (ROS) a mitochondriální aparát. Buněčné ROS jsou regulátoři imunitní signalizace, ale také slouží i jako imunitní odpověď [65]. U fagocytózy uvolňují fagocyty baktericidní hydroxylové radikály. Nadbytek ROS však může vést k oxidativnímu poškození a další apoptóze imunitních buněk. Proto se k monitorování celkové hladiny ROSů využívají komerční soupravy ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) testy a imunofluorescenční barvení [66; 67]. Dalším typem detekce různých ROSů a RNS (reaktivní formy dusíku) je pomocí kovově koordinovaných fluorescenčních a luminiscenčních sond. Dalším typem stanovení je měření mitochondriální DNA pomocí kapkové digitální PCR (ddPCR) [63].

U imunitní dysfunkce se hledají změny ve fagocytóze a sekreci cytokinů. Imunitní buňky mohou být pozorované pod metodami jako je světelná mikroskopie, rastrovací elektronová mikroskopie nebo ve fluorescenční mikroskopii po fluorescenčním obarvení například faloidinem. Při sledování fagocytózy se používají profesionální fagocyty (makrofágy a neutrofilů) a hemocyty z vodních organismů [68; 69]. Klasickou metodou je pozorování fagocytární aktivity fagocytovaných bakterií a buněk kvasinek pod optickým mikroskopem s velkým zvětšením, popřípadě využití neutrální červeně po lýze fagocytů. Oba tyto testy jsou značně subjektivní a mají nižší citlivost. Modernějším typem testování jsou komerční sady latexových kuliček nebo *E.coli* průtokovou cytometrií, popřípadě fluorescenční mikroskopii [70]. Následně je zapotřebí vypočítat fagocytární aktivitu, a to lze dvěma způsoby: prvním je rychlost fagocytózy = počet fagocytovaných buněk/spočítané buňky a druhým je fagocytární účinnost = počet pohlcených částic/spočítané buňky [71]. Nebo lze používat metody, během nichž dochází k zastavení fagocytózy tzv. Buněčné fixativě. Toho lze dosáhnout použitím ledově vychlazeného metanolu nebo 4% paraformaldehydu či ledově vychlazený PBS [72]. Za to chemokiny a cytokiny se detekují ELISA testy. Principem ELISA testu je interakce antigenu s jeho specifickou protilátkou. Pokud se cílový protein naváže na odpovídající antigen značený

enzymem, spustí se barevná reakce, kterou je možné detekovat a kvantifikovat [73]. Dále se využívá i multiplexní sendvičová imunoanalýza založená na průtokové cytometrii. Kdy mikrokuličky, využívané v testu, slouží jako nosič odpovědí ligand-receptor, to umožňuje kontakt cíl-protilátka. V následující tabulce je výběr imunotoxických fenotypů, měření a odpovídajících kontaminantů [63]. V následující Tabulce č. 3. si dovoluji vypsát výběr imunotoxických fenotypů, měření a různé druhy kontaminantů. Tento výběr je inspirován z přehledového článku, ve kterém se věnovali také problematice *in vitro* testování imunotoxicity.

Tabulka 3 -Výběr imunotoxických fenotypů, měření a odpovídajících kontaminantů [63].

Měření	Kontaminant	Druhy kontaminantů	Imunotoxicita
Životaschopnost buněk	Ivermektin	Parazitocid	Snížená životaschopnost buněk
	Bisfenol S	Plastová přísada	Apoptóza
Oxidační stres	Cis-bifenthrin	Pesticid	Zvýšená hladina buněčného ROS
	Chlorpyrifos	Pesticid	Inhibovaná produkce NO
Fagocytóza	2,3,3',4,4'-pentachlorbifenyl	Polychlorovaný bifenyl	Zvýšená fagocytóza
	Arsen	Těžký kov	Snížená fagocytóza

In vivo metody hodnocení imunotoxicity

In vivo metody jsou náročnější, dražší a často neetického charakteru. Avšak jsou stále součástí preklinických studií imunotoxicity tak, aby se identifikovaly a odstranily potenciální obavy například před podáním nových léků, popřípadě zdravotnických přípravků [74]. Tyto testy zahrnují analýzu hmotnosti lymfoidních orgánů, histologické hodnocení imunitních orgánů a tkání, pochopení klinických chemických parametrů a hematologie minimálně u dvou živočišných druhů – hlodavce (potkan) a nehlodavce (pes) [75]. Extrapolace ze získaných testů a poznatků na lidský organismus je často složitá díky rozdílům ve složení, organizaci a citlivosti na určité látky mezi lidským imunitním systémem a zvířecím druhem použitý k testování [74]. Tyto testy detekují silnou imunosupresi a imunostimulaci a jejich citlivost na střední

imunotoxicitu je dána z imunitní dysregulace. Tento fakt je prospěšný pro identifikaci léků, jenž způsobují imunotoxicitu u lidí [76].

1.4.2 Metody hodnocení imunotoxicity látek u bezobratlých

U bezobratlých živočichů se k hodnocení imunotoxicity využívají *in vivo* a *in vitro* testy. V dostupné literatuře se imunotoxicita zkoumá především na imunokompetentních buňkách (coelomocytech). K tomuto účelu je zapotřebí nejdříve coelomocyty vypudit, či tzv. extrudovat z organismu do fyziologického roztoku. V dostupných člancích existují různé *in vitro* metody extruze coelomocytů, s využitím například:

- Etanolu
- Elektrického proudu
- Teploty
- Ultrazvuku

Extruze etanolem

Eyambe a kol. [77] se ve své práci zabývali neinvazivní metodou odběru coelomocytů žížal a to tak, že každý červ byl opláchnut ve studeném solném roztoku Lumbricus (LBSS) a následně umístěn na papírový ručník. U každého červa byla následně zadní část těla lehce masírována tak, aby došlo k vypuzení obsahu dolního střeva. Poté následovala již extruze coelomocytů žížal etanolem. Každý červ byl vložen na 3 minuty do 15ml polypropylenové zkumavky obsahující 3,0 ml studeného vytlačovacího média. Extruzní médium obsahovalo 5% etanol a 2,5 mg/ml mukolytického činidla. Po 3 minutách byl červ vyjmut a objem byl doplněn přidáním 12 ml vychlazeným LBSS bez vápníku. Toto médium obsahovalo 1,5 mM NaCl, 4,8 mM KCl, 1,1 mM MgSO₄·7H₂O, 0,4 mM KH₂PO₄, 0,3 mM Na₂PO₄·H₂O a 4,2 mM NaHCO₃, poté bylo upraveno na pH 7,3 a osmolarita upravená na 300 mmos. Následně byly buňky dvakrát promyty stejným médiem a získány centrifugací při 150 g po dobu 15 minut při 4 °C. Poté byly buňky resuspendovány v Ca-LBSS. Toto médium obsahovalo navíc ještě 3,8 mM CaCl₂ [78].

Extruze elektrickým vytlačováním

Stejně tak, jako tomu bylo u extruze etanolem, tak i zde byl každý červ nejdříve opláchnut ve studeném LBSS a umístěn na papírový ručník. Opět byla masírována zadní třetina těla, aby došlo k vypuzení obsahu střeva [77]. Následně byl každý červ vložen do 15ml polypropylenové zkumavky obsahující 3 ml studeného Ca-LBSS. Poté byl červ 10x stimulován pomocí krátkého časového úseku (1 s) střídavému proudu 6 V. Nakonec byly zkumavky lehce protřepány a červ byl odstraněn [79].

Extruze teplotním šokem

Třetím typem extruzní metody je stres působením tepla nebo chladu. Červi byli nejdříve opláchnuti a masírováni pro odstranění obsahu dolního střeva. Poté byli jedinci vystaveni teplotnímu šoku. V případě vysokých teplot lze nalézt práce, kde autoři vystavili žížaly teplotě 45 °C po dobu jedné minuty, po 8–10 opakováních. U nízkých teplot zase jedince vystavili teplotě 4 °C po dobu 1–2 minut a opět s 8–10 opakováními. Nakonec zkumavky byly lehce promíchány a červi byli ze zkumavek odstraněni [80].

Extruze ultrazvukovou lázní

I u posledního typu extruzních metod byl každý červ nejprve opláchnut v ledovém LBSS a následně promasírován pro odstranění obsahu střeva. Poté byl každý červ vložen do 15ml polypropylenové zkumavky, která obsahovala 3 ml Ca-LBSS. Tato zkumavka byla vložena do ultrazvukové lázně, kde byli červi vystaveni přibližně 10 expozicím po 2-3 s, dokud se roztok nezakalil. Nakonec byla zkumavka lehce protřepána a červi byli odstraněni [81].

Výsledné suspenze, obsahující převážně buňky coelomocyty, byly u všech typů extruzních metod následně zkoumány a hodnoceny pomocí optické a fluorescenční mikroskopie, analýzy na průtokovém cytometru, fluorimetrické detekce či počítání buněk v Bürkerově komůrce. U všech typů hodnocení byl sledován účinek látek na životaschopnost buněk – konkrétně eleocytů a amébocytů a jejich schopnost fagocytovat [81]. Například v práci Sauvé a kol. [82] byl testován potenciál vybraných stopových prvků inhibovat fagocytární aktivitu extrudovaných coelomocytů získaných z různých druhů červů. Autoři práce exponovali extrudované buňky po dobu 18 hodin vybranými stopovými prvky. Poté hodnotili životaschopnost a fagocytární aktivitu buněk pomocí průtokové cytometrie. Bylo zjištěno, že nejúčinnějším imunotoxickým prvkem s 50% inhibicí fagocytózy byla rtuť o koncentraci v rozmezí od 10^{-7} do 10^{-6} M. Jako další stopové prvky s imunotoxickým účinkem byly prokázány kadmium, nikl, měď aj. Efektivní koncentrace těchto stopových prvků se pohybovala v rozmezí od 10^{-5} do 10^{-4} M.

Průtoková cytometrie

Jak již bylo zmíněno, tak průtoková cytometrie je metoda, která umožňuje v reálném čase sledovat relativní počet a tvar různých buněčných populací. Hlavní podstatou této metody je systém, jenž využívá principy citlivé detekce světelného signálu a mikroskopie. V průtokové cytometrii jsou buňky unášeny proudem nosné kapaliny do měrné cely, kde jsou následně

analyzovány. Existují dva typy detekce – první z nich funguje na bázi tzv. Coulterova principu, kdy měrná celá zaznamenává průchod buňky jako změnu elektrické vodivosti či rezistivity. Velikost změny je pak úměrná objemu procházející buňky. Druhou možností je měření světelného signálu, kdy je při průchodu buňky paprskem světla analyzováno kvantum fotonů dopadajících na fotodetektor. Na ten dopadají dva druhy paprsků – první je ve směru původního paprsku, označovaný jako „forward scatter“ (FSC) a druhý pod úhlem 90°, ten je označovaný jako „side scatter“ (SSC) [83]. FSC určuje velikost buněk, SSC určuje vnitřní složitost buněk. Například v jedné studii se autoři Hendawi a kol. zabývali schopností fagocytózy u hemocytů mlžů, kterou monitorovali pomocí průtokové cytometrie. U hemocytů mlžů byly coelomocyty smíchané se žlutozelenými latexovými částicemi FluoSpheres a následně inkubované po dobu 18 hodin. Po inkubaci byly proměřeny dle navolených parametrů SSC a FSC na průtokovém cytometru. Princip tohohle stanovení spočívá v tom, že buňky fagocytují latexové kuličky, tudíž fluorescence latexových kuliček poklesne, jelikož paprsek nedopadá na kuličku, nýbrž na buňku. Fluorescenční emise byly shromážděny při 520 nm. Pro každý vzorek se získalo 10 000 událostí a zároveň tato studie prokázala výskyt malých buněk (amébocytů) s nízkým FSC a velkých buněk (eleocytů) s vysokým SSC [81].

Spektrofluorimetrická analýza

Spektrofluorimetrie je jednou z metod s rychlou, nedestruktivní a neinvazivní analýzou s vysokou citlivostí měření [84]. Principem této metody je, že elektronicky excitované látky, popřípadě jejich elektrony jsou excitované zářením, jenž má svůj vlastní zdroj. Po této excitaci dochází k přechodu elektronů v orbitalech z nižší energetické hladiny na tu vyšší. Každá molekula má řadu energetických hladin, jenž absorbuje velké kvantum světla, které je energeticky úměrné rozptylu mezi oběma energetickými stavy. Proto se může pohybovat z nižší energetické hladiny na vyšší. Tento jev je taky označován jako zářivý přechod a přetrvává jen krátkou chvíli, než se elektron vrátí zpět na nižší energetickou hladinu. Přičemž při přechodu elektronů dochází k vyzáření přebytečné energie ve formě světla/energie nebo fotonu. Spektrofluorimetrie detekuje právě takovéto vyzáření přebytečné energie [85; 86]. Fluorescence patří do skupiny fotoluminiscence. Fluorescence je ovlivňována řadou faktorů jako je změna hodnoty pH, polarita rozpouštědla, přítomnost zhášecích látek aj. Fluorescence je využívána pro kvantifikaci materiálů měřením intenzity emise při vhodné excitační vlnové délce [87]. Součástí fluorescence jsou fluorochromy, také označované jako fluofory, které jsou přirozené nebo syntetické. Do skupiny umělých fluoforů jsou řazeny fluorescenční sondy, jenž existuje mnoho druhů. Ty jsou přidávány k testovaným vzorkům, u nichž dochází k neinvazivní

detekci různých jevů [88]. Svou nezastupitelnou funkci mají fluorescenční sondy v genetice, kde je pomocí nich detekována například jaderné DNA pomocí fluorescenční sondy DAPI [89]. Mezi přirozené fluorochromy jsou řazeny vnitřní fluorory obsažené uvnitř buněk daného organismu. Jedním z úkolů této práce je právě stanovení takového vnitřního fluoroforu, který je součástí těla roupic. Bylo zjištěno, že součástí těla roupic, respektive buněk eleocytů je vnitřní neboli přirozený fluofofor riboflavin [90]. V literatuře lze najít i metody spektrofluorimetrického stanovení riboflavinu v lyzátu eleocytů. Podstatou tohoto stanovení je rozdíl mezi exponovanou skupinou, kterou vyvolá imunotoxická látka, jež ovlivňuje eleocyty, a kontrolou. Přičemž riboflavin se excituje při 370 nm a emituje při 520 nm. Intenzita emitovaného světla závisí na koncentraci fluorescenčního analytu [91].

2 CÍLE PRÁCE

Hlavním cílem této diplomové práce byla izolace a identifikace buněk coelomocytů z organismu *Enchytraeus crypticus* a následné analýzy (buněčných suspenzí a homogenátu tkáně roupic), zda jsou tyto buňky vhodné jako citlivé biomarkery imunotoxicity. Jedním ze sledovaných biomarkerů bylo pozorování změn v podobě relativního počtu coelomocytů a jejich strukturních změn po vystavení organismu *E. crypticus* toxickou látkou, a to chloridem nikelnatým v ekotoxikologickém testu.

Dílčím cílem práce bylo optimalizovat extruzní metody vypuzení buněk coelomocytů z organismu *E. crypticus* pomocí analýz na optickém a fluorescenčním mikroskopu, spektrofluorimetru a průtokovém cytometru.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1.1 Příprava roztoků

Rekonstituovaná voda byla používána jako živné médium pro rouvice. Pro její přípravu bylo zapotřebí odebrat následné množství chemikálií, které je znázorněné v Tabulce č. 4. Všechny chemikálie jsou odvážené, odebrané a vztažené k 1 l demineralizované vody.

Tabulka 4 - Chemikálie potřebné pro výrobu rekonstituované vody.

Pořadí	Činidla	Množství (g/l)	Množství roztoku (ml) odebrané do 1 l
1	0,2 M CaCl ₂	22,2	10
2	0,1 M MgSO ₄	25,2 (heptahydrát)	5
3	0,1 M NaHCO ₃	8,6	7,7
4	0,01 M KCl	0,74	7,8

Hankův roztok (HBSS) byl používán také jako živné médium pro rouvice. Pro jeho přípravu bylo zapotřebí odebrat následné množství chemikálií, které je znázorněné v Tabulce č. 5. Všechny chemikálie jsou vztažené k 500 ml demineralizované vody.

Tabulka 5 - Činidla a navážky pro přípravu Hankova roztoku.

Pořadí	Činidla	Množství (g)
1	NaCl	4,000
2	KCl	0,200
3	NaHCO ₃	0,175
4	KH ₂ PO ₄	0,030
5	Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	0,060
6	CaCl ₂	0,070
7	MgCl ₂ · 6 H ₂ O	0,023
8	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,030
9	D-glukóza	0,545

3.2 Materiál

3.2.1 Modelové organismy

Tato diplomová práce byla zaměřena na roupice, konkrétně na *Enchytraeus crypticus*.

3.2.2 Laboratorní pomůcky

- Petriho misky
- Erlenmeyerovy baňky
- Odměrné baňky
- Kádinky
- Štětce
- Pinzety
- Lžičky
- Pausturovy pipety
- Injekční stříkačky
- Filtr
- Skleněné láhve se šroubovacím uzávěrem
- Automatické pipety
- Pipetovací špičky
- Skalpel
- Podložní a krycí sklíčka
- Hliníková fólie
- Vata buničitá
- Mikrozkuřavky (Eppendorf, Německo)
- 96jamkové mikrotitrační destičky (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)
- Pinzeta
- Černá fólie

3.2.3 Laboratorní přístroje

- Analytické váhy ABT 220-4M (Kern & Sohn GmbH, Německo)
- Analytické váhy (Mettler Toledo, Švýcarsko)
- Destičkový spektrofotometr a spektrofluorimetr Spark (Tecan, Rakousko)
- Fluorescenční mikroskop Nikon Eclipse 80i (Nikon, Japonsko)
- Horkovzdušný sterilizátor 5104.2 (BMT Medical Technology s.r.o., Česká republika)
- Homogenizátor ruční (Benchmark, Malajsie)

- Chladnička (Goddes, Česká republika)
- Inkubátor Heratherm Compact IMC18 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Lázeň ultrazvuková DT 31 H + VKO D08 (Bandelin electronic, Berlín)
- Míchačka magnetická W/Heat VMS-C4 (VWR advancer, ČR)
- Odstředivka (Fisherbrand Midi compact, USA)
- Optický mikroskop Levenhuk MED D45T (Levenhuk, Med series, USA)
- pH metr CyberScan pH 110 (VWR advancer, ČR)
- Průtokový cytometr (Beckman coulter, Cyan ADP, USA)
- Třepačka Vovibrační Heidolph Vibramax 100 (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Německo)
- Softwaru NIS-Elements AR 5.11.03
- Systém pro výrobu redestilované vody Milli-Q® Direct 8 (MilliporeSigma, USA)

3.2.4 Seznam chemikálií a reagensů

- Dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4 , $M_r = 136,086 \text{ g/mol}$; Penta; ČR)
- D-Glukóza monohydrát ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$; $M_r = 180,155 \text{ g/mol}$; Penta; ČR)
- Ethyl alkohol 99,8% ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$; $M_r = 46,07 \text{ g/mol}$; Lach:ner, ČR)
- Hexahydrát chloridu hořečnatého ($\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$; $M_r = 203,303 \text{ g/mol}$ (hexahydrát), $95,211 \text{ g/mol}$ (bezvodý), Merck, Německo)
- Hexahydrát chloridu nikelnatého ($\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$; $M_r = 237,69 \text{ g/mol}$ (hexahydrát), $129,69 \text{ g/mol}$ (bezvodý); Penta, ČR)
- Heptahydrát síranu hořečnatého ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; $M_r = 120,366 \text{ g/mol}$; Lach:ner, ČR)
- Hydrogenuhlíčitan sodný (NaHCO_3 ; $M_r = 84,007 \text{ g/mol}$; Lach:ner, ČR)
- Hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$; $M_r = 358,14 \text{ g/mol}$ (dodekahydrát), $142,14 \text{ g/mol}$ (bezvodý); Signa aldrich; USA)
- Chlorid draselný (KCl , $M_r = 74,5513 \text{ g/mol}$; Lach:ner, ČR)
- Chlorid sodný (NaCl ; $M_r = 58,44 \text{ g/mol}$; Lachema, ČR)
- Chlorid vápenatý (CaCl_2 , $M_r = 110,98 \text{ g/mol}$; Lach:ner, ČR)
- Methylenová modř (0,1% vodný roztok)

3.3 Podmínky laboratorního chovu roupic

Roupice, *Enchytraeus crypticus*, za normálních podmínek žijí v půdním prostředí, avšak pro vědecké účely je možné je chovat na agaru. Roupice v něm nestrádají a jejich chov na agaru je levnější a jednodušší na přípravu. Chov je potřeba jednou za 1 až 2 měsíce přemístit do čerstvě připraveného agaru. Ten je připravován do Petriho misek s ventilací, aby byl zpřístupněn neustálý přísun kyslíku. Takto připravený chov je pak kultivován v termostatu ve tmě při (19 ± 2) °C. Roupice by měly být krmeny minimálně dvakrát v týdnu jemně nadrcenými ovesnými vločkami, které by se měly jednou za 1-2 měsíce sterilizovat.

Potřebné chemikálie pro přípravu chovného agaru:

- 13,6 g Bacto-Agar
- 772 ml ultračisté vody
- 8 ml roztoku č. 1 (CaCl_2)
- 8 ml roztoku č. 2 (MgSO_4)
- 6 ml roztoku č. 3 (NaHCO_3)
- 6,4 ml roztoku č. 4 (KCl)

Postup přípravy chovného agaru vychází z navážení Bacto-Agaru do příslušného laboratorního skla. K této navážce je přidána demineralizovaná (ultračistá) voda a všechny výše zmíněné roztoky. Výsledný roztok byl uzavřen alobalem a nechán autoklávovat při 120° po dobu 30 minut. Poté bylo nutné zajistit, aby pH agaru bylo v rozmezí 7 - 7,5. Takto připravený roztok byl lehce promíchán, a ještě za horka vléván do předchystaných a nadepsaných Petriho misek s ventilací. Přelévání bylo prováděno po celou dobu v digestoři. Ta byla před prací vydezinfikována 70% etanolem a vysvícena UV světlem po dobu 5 minut. Po vychladnutí agaru bylo do každé Petriho misky s ventilací přenesena část kultury roupic. Takovýto chov byl uchováván ve tmě v termostatu při (20 ± 1) °C.

Manipulace s roupicemi:

- Při práci s tímto druhem je vhodný namočený štěteček, popřípadě háček
- Při posuzování viability stačí roupici vložit jen do kádinky, popřípadě Petriho misky s pitnou vodou – pokud je roupice živá, začne se nápadně hýbat.



Obrázek 11 - Očištění roupic *E. crypticus* ve vodě.

3.4 Test toxicity ve vodním prostředí

Cílem tohoto testu je určit efektivní koncentraci, která způsobí 50% mortalitu (EC_{50}) a současně zjistit, jaká koncentrace ještě nezpůsobí mortalitu. Takováto koncentrace se taktéž označuje jako NOEC (No Observable Adverse Effect Concentration) neboli koncentrace bez pozorovaného nepříznivého účinku. Pod úrovní této hodnoty lze pro mortalitu očekávat různé efekty na biologické úrovni – jako je oxidativní stres nebo imunotoxicita. Jako testovaná látka byl zvolen chlorid nikelnatý. Tato látka byla zvolena na základě publikace, ve které autoři testovali toxicitu různých stopových prvků a jejich efekt na inhibici fagocytózy u extrudovaných coelomocytů u více druhů červů [82].

Testování obecně je třeba provést vždy ve třech úrovních a v každé úrovni je zapotřebí test minimálně dvakrát zopakovat tak, abychom měli srovnávací data. Tyto tři úrovně zahrnují:

- Limitní test (ten zahrnoval jednu vysokou koncentraci – v našem případě 100 mg/l $NiCl_2$ a kontrolu)
- Předběžný test (zahrnoval široké koncentrace v rozmezí 0,01; 0,1; 1; 10; 100 mg/l $NiCl_2$ a kontrolu)
- Definitivní test (zahrnoval dva typy testů – jeden pro potvrzení EC_{50} s koncentracemi v rozmezí 1,25-12,5 mg/l a druhý typ testu s koncentracemi v rozmezí 4-4,4 mg/l na potvrzení, že roupice v přítomnosti nízké koncentrace neumírají, ale zároveň v těchto koncentracích docházelo k ovlivnění buněk imunitního systému roupic)

Před každým testem bylo zapotřebí všechny roupice řádně omýt od agaru v pitné vodě. Test byl proveden ve skleněných kádinkách o objemu 25 ml. Pro test bylo zvoleno 5 různých

koncentrací toxické látky. V každé testované koncentraci bylo exponováno 100 kusů dospělých roupic (25 roupic/kádinku). Roupice byly vystaveny různým koncentracím roztoku NiCl_2 , který byl připraven ze zásobního roztoku (100 mg/l). Tento zásobní roztok byl připraven navážením a rozpuštěním $\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ v rekonstituované vodě. Každá replika obsahovala 10 ml testované látky. Všechny typy testů byly inkubovány ve tmě při teplotě $(19 \pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$ a po dobu 72 hodin. Během celé doby testování roupace nebyly krmeny. Po 72 hodinách byla vyhodnocena mortalita a výsledek statisticky zpracován.

3.5 Metody získávání buněčných suspenzí

Jak již bylo zmíněno v kapitole 1.3.4., existuje mnoho typů extruzních *in vitro* metod, díky kterým získáme buněčnou suspenzi s předpokládanými buňkami. V této práci byly zpracovány tři typy optimalizovaných extruzních metod – extruze etanolem, elektrickým vytlačováním a ultrazvukem.

Odběr roupic z chovu

Před všemi typy extruzních metod bylo zapotřebí nejdříve roupace opláchnout od agarů a jiných nečistot. Roupice byly vloženy do připravených Petriho misek, obsahující vytemperovaný roztok HBSS na laboratorní teplotu, po dobu 20 minut. Za tuto dobu byly roupace nejenom opláchnuté, ale zároveň došlo k odstranění obsahu jejich střeva. S takto očištěnými roupicemi bylo nakládáno dále dle typu extruzních metod.

Extruze etanolem

Očištěné roupace byly převedeny do 5ml zkumavky, v níž je připravený 15% roztok etanolu s HBSS. Roupice byly ve zkumavce ponechány po dobu 5 minut. Poté byly roupace ze zkumavky odstraněny a zbylý roztok byl dvakrát přečištěn za pomoci Hankova roztoku. Přečištění probíhalo ve stolní centrifuzě při 2000 otáčkách po dobu 2 minut. Po této fázi byly zařazeny další promývací úseky, ale tentokrát pro získání coelomocytů a odstranění velkých nečistot. Přehled jednotlivých otáček a času je zobrazen v Tabulce č. 6.

Tabulka 6 - Centrifugační postup u extruze etanolem.

Počet cyklů	Čas (min)	Počet otáček (RPM)/min
1.	3	2000
2.	2	3000
3.	2	5000
4.	1	6000

Extruze elektrickým vytlačováním

U této metody bylo 25 dospělých roupic nejdříve očištěno a následně převedeno do 1,5ml zkumavky, v níž byl připraven 1 ml sterilního HBSS. Poté do takto připravené zkumavky byly opatrně vkládány a vyndávány platinové drátky vedoucí z baterie (9 V). Každým vložením drátku do roztoku byl dán roupicím pulz. Vždy bylo použito celkem 15 pulzů a mezi pulzy byla pauza trvající 3 sekundy. Po 15 pulzech byl získán zakalený vzorek, který byl nejdříve očištěn od zbytků těl roupic a následně byl centrifugován za stejných podmínek jak u extruze etanolem.

Extruze ultrazvukovou lázní

Očištěných 25 dospělých roupic bylo převedeno jemně štětečkem do 1,5ml zkumavky, v níž bylo odpiptetováno 1 ml sterilního HBSS. Takto připravená zkumavka byla vkládána do ultrazvukové lázně. Roupice byly vystaveny 20 pulzům a mezi jednotlivými pulzy byla pauza trvající 3 sekundy. Po těchto ultrazvukových pulzech byla sledována vizuální změna vzorku, kdy došlo k tvorbě bílého zákalu. Takto připravený vzorek byl promíchán na vortexu tak, aby veškeré roupace zůstaly usazeny pouze na dně zkumavky. Následně byl odebrán supernatant tak, aby všechny roupace zůstaly na dně zkumavky. Tento supernatant byl následně odstředěn na centrifuze o průměru rotoru 30 mm. Centrifugace probíhala při laboratorní teplotě nejdříve při nižších otáčkách a vyšším času tak, aby došlo k dokonalému oddělení velkých nečistot (degradovaná tkáň roupic) od coelomocytů. Po každé centrifugaci dojde k vyjmutí supernatantu od pelety, přičemž ta je naředěna následně Hankovým roztokem a důkladně promíchána. Každý další supernatant je stáčen při vyšších otáčkách. Přehled jednotlivých otáček, času a cyklů je zobrazen v Tabulce č. 7.

Tabulka 7 - Centrifugační postup u extruze ultrazvukovou lázní.

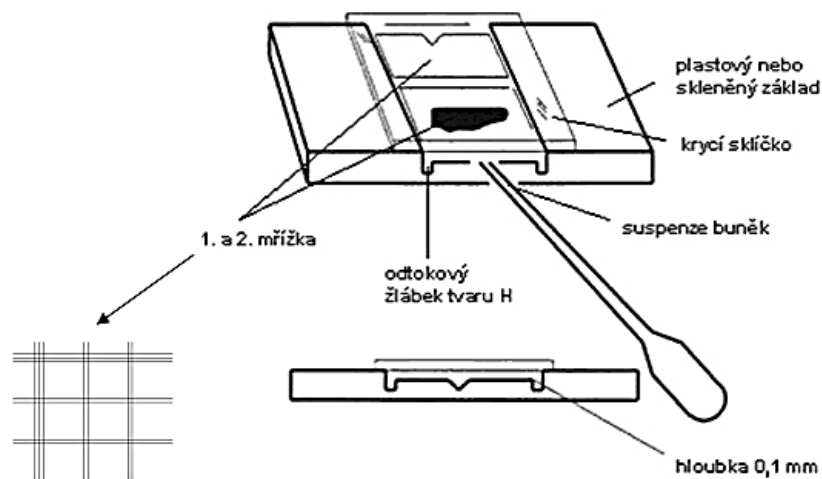
Počet cyklů	Čas (min)	Počet otáček (RPM)/min
1.	3	2000
2.	1	4000
3.	1	6000

Výše zmíněné extruzní metody mají za cíl dostat z těla roupic co nejvíc buněk coelomocytů. V případě granulárních amébocytů a eleocytů je tento efekt pozorován, avšak hyalinní amébocyty pozorovatelné nebyly. Proto všechny vzorky získané jakoukoliv extruzní metou byly navíc obarveny buněčnou suspenzí barvivem May Grünwald a Giemsovo barvení. Touto barevnou suspenzí lze pozorovat ohraničený hyalinní amébocyt. Nyní bude popsán postup pro May-Grünwald-Giemsovo barvení:

- Pasteurovou pipetou byla kápnuta kapka buněčné suspenze, která byla získaná z jakékoliv extruzní metody popsané výše, na podložní sklíčko
- Po uschnutí této kapky bylo vloženo podložní sklíčko na 3 minuty do May-Grünwaldova roztoku
- Poté podložní sklíčko bylo oplachováno zhruba 1 minutu v destilované vodě
- Následně bylo ponořeno do Giemsova roztoku (kdy poměr barviva a vody byl 1:3) po dobu 15 minut.
- Na závěr se sklíčko opláchlo destilovanou vodou a obarvený vzorek se nechal samovolně uschnout
- Takto připravený preparát byl pozorován na optickém mikroskopu

3.5.1 Počítání na Bürkerové komůrce

Bürkerova komůrka se používá k ustálení objemů dané buněčné suspenze a pro detekci počtu buněk. Její detail včetně počítací mřížky je znázorněn na Obrázku č. 13.



Obrázek 13 - Bürkerova komůrka s detailem počítací mřížky, obrázek byl převzat z [92].

V této práci bylo pomocí Bürkerovy komůrky zjišťováno množství coelomocytů v 1 ml buněčné suspenze. Následně byla sledována i životaschopnost buněk coelomocytů, získaných z jednotlivých extruzních postupů, pomocí methylenové modři. Hodnocení všech testů bylo 4x opakováno. Z jakékoliv buněčné suspenze získané z extruzních metod bylo odebráno 10 μ l na jednu mřížku Bürkerovy komůrky. Na druhou mřížku Bürkerovy komůrky bylo napipetované stejné množství buněčné suspenze, a navíc bylo přidáno i 10 μ l methylenové modři. Principem stanovení životaschopnosti buněk získaných z extruzních metod spočívá v tom, že mrtvé buňky do sebe přijmou modré barvivo a nejsou schopny ho vypumpovat ven, za to ty živé tuto schopnost mají. Tím se snadno odliší živé buňky od těch mrtvých. Příklad výběru daných mřížek pro počítání buněk je zobrazen na Obrázku č. 14.



Obrázek 14 - Vlevo znázorněný postup vybírání čtverců, vpravo výběr jednoho z čtverců a ukázka počítání buněk (černé buňky se počítají, bílé ne) [92].

Počet buněk 1 ml buněčné suspenze lze vypočítat dle následujícího vzorce:

$$[\text{počet buněk (napočítané)/9}] \cdot 16 \cdot 10000 = \text{výsledný počet buněk/ml}]$$

3.5.2 Využití průtokové cytometrie

Jak již bylo zmíněno v kapitole 1.4, průtokový cytometr slouží k analýze velkého množství buněk v reálném čase. Pro tento typ testu bylo zapotřebí přidat více promývacích kroků suspenze a odmytí nečistot tak, aby nedocházelo k mechanickému poškození přístroje. Jednotlivé změny v centrifugačních otáčkách a časech jsou popsány v Tabulce č. 8.

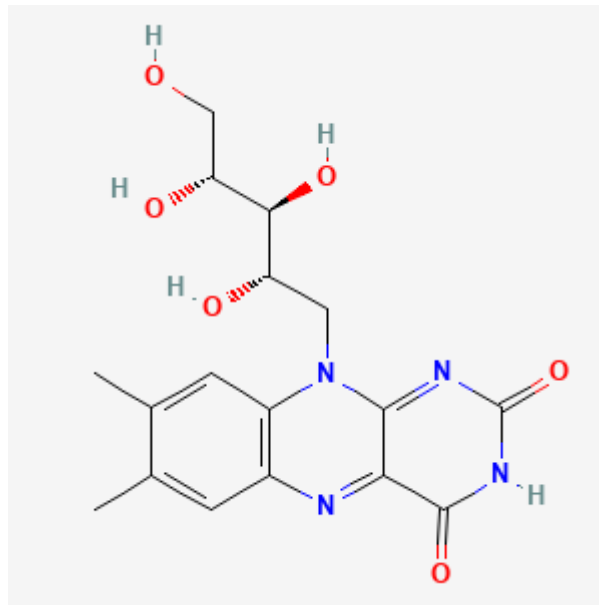
Tabulka 8 - Centrifugační postup pro průtokovou cytometrii.

Počet cyklů	Čas (min)	Počet otáček (RPM)
1.	3	1000
2.	2	3000
3.	1,5	4000
4.	1	6000

Buněčná suspenze získaná extruzí z ultrazvukové lázně byla řádně zcentrifugována podle postupu uvedeného v Tabulce č. 8. Následně byla buněčná suspenze odebrána do speciálních zkumavek pro cytometrické měření. Vstup vzorku do průtokového cytometru byl zprostředkován podavačem pro zkumavky. Analýza vzorku byla zajištěna přes hydrodynamickou fokusaci, kdy každá jednotlivá buňka byla analyzována samostatně. Výstup signálu byl změřen v optické části a v elektronické části byla detekovatelná data. Všechna měření probíhala za laboratorní teploty, přičemž délka jednoho měření trvala přibližně minutu. Další podmínky měření na cytometru byly následující – fluorescence byla měřena pomocí FITC detektoru o napětí 580 a gainu 10; pro FS detektor byl použit gain 10; pro SS detektor o napětí 480 a gainu 3; Trigger: FS; Threshold: 0,1 %. Maximální počet naměřených událostí bylo 500 000 a rozlišení pro forward scatter na ose x bylo použito 512. Tento průtokový cytometr měl tři lasery – 488 nm, 405 nm a 635 nm. Získaná pilotní data z cytometrické analýzy byla hodnocena podle granularity (SSC) a velikosti buněk (FSC). Detekované buňky byly označeny podle autorů Irizar a kol. [93].

3.6 Sledování obsahu riboflavinu v eleocytech fluorimetricky

Podmínky stanovení riboflavinu byly odvozeny ze studie od autorů Płytycz a kol. [94] a následně byly tyto podmínky pro účel této práce optimalizovány pro extrudované buněčné suspenze a homogenáty. Riboflavin u rouspic je přirozeně součástí buněk eleocytů. Rouspice, které jsou součástí laboratorního chovu přijímají riboflavin prostřednictvím potravy, kterými jsou sterilní rozemleté ovesné vločky. Struktura riboflavinu je znázorněna na obrázku č. 12.



Obrázek 12 - Struktura riboflavinu, obrázek převzat z [95].

3.6.1 Analýza extrudovaných buněk z buněčných suspenzí

Analýza extrudovaných coelomocytů z buněčných suspenzí byla hodnocena vždy po stejné době jako akvatický test toxicity. Tento typ testu vyžadoval nasazení takových koncentrací toxické látky, u nichž byla sledována mortalita i možný imunotoxický efekt u rouspic. Koncentrace byly následující 4,2; 4,4; 5; 7,5; 10; 12,5 mg/l. Po 72 hodinách byly rouspice šetrně štětečkem přeneseny do 2ml zkumavky, ve kterých byl sterilní Hankův roztok. Následně byly vzorky vloženy do ultrazvukové vodní lázně, v níž probíhala extruze coelomocytů. Každý vzorek byl do této lázně ponořen 20x po dobu 3 sekund. Poté byl veškerý supernatant odebrán a odstředěn. Podmínky odstředění jsou již napsány v kapitole 3.4. pro extruzi ultrazvukovou lázní. Získané vzorky (po každém opakování testu) byly následně proměřeny na spektrofluorimetrickém zařízení a na průtokovém cytometru.

3.6.2 Analýza homogenátu tkáně roupic

Analýza coelomocytů z homogenátu tkáně roupic se prováděla vždy po 72 hodinách. Tento typ testu se také prováděl při takových koncentracích toxické látky, při které byla pozorována mortalita, ale zároveň i imunotoxické biomarkery. Proto byly zvoleny následující koncentrace 4,2; 4,4; 5; 7,5; 10; 12,5 mg/l. Po 72 hodinách byly rouvice šetrně štětečkem přeneseny do 2ml zkumavky, ve kterých byl sterilizovaný Hankův roztok. Každý vzorek byl následně vkládán do homogenizátoru, tzv. ultrazvukový/homogenizační prst, po dobu 1 minuty. Následně byl každý vzorek odstředěn při 2000 otáčkách po dobu 1 minuty pro usazení velkých nečistot. Takto připravené vzorky (po každém opakování testu) byly dále proměřeny na spektrofluorimetrickém zařízení a na průtokovém cytometru.

3.6.3 Fluorescenční detekce riboflavinu v eleocytech

Pro vizualizaci vzorků ve fázovém kontrastu a pro detekci autofluorescence riboflavinu byl použit fluorescenční mikroskop Nikon Eclipse 80i. Pro fluorescenční mikroskopii byly použity vzorky homogenátu tkáně roupic a suspenze coelomocytů získané pomocí extruzní metody ultrazvukovou vodní lázní. Z obou vzorků (po dvou opakování) bylo odebráno 100 μ l supernatantu, jenž bylo přepipetováno na podložní sklíčko. Následně bylo přidáno krycí sklíčko pod úhlem 45°. Vzorky byly vizualizovány ve fázovém kontrastu při zvětšení 200x. U vzorků byla sledována vlastní fluorescence riboflavinu s využitím filtru FITC (480/30 nm). Získaná reprezentativní data byla pořízena a zpracována pomocí softwaru NIS-Elements AR 5.11.03.

3.6.4 Fluorimetrická detekce riboflavinu v eleocytech

Pro spektrofluorimetrická měření byla použita suspenze coelomocytů získaných pomocí extruze v ultrazvukové vodní lázni nebo homogenát tkáně roupic získané ručním homogenizátorem. Ze všech testovaných vzorků (po třech opakování) bylo odebráno 100 μ l supernatantu, jenž bylo přepipetováno do 96jamkové černé destičky. Vzorek byl poté 10 s míchán a měřen při 37 °C s využitím destičkového spektrofluorimetru SPARK (Tecan, Rakousko) při Ex/Em = 490/550 nm.

3.7 Design testu s optimalizovanými postupy stanovení biomarkerů imunotoxicity

V tomto případě se vycházelo z akutního vodního testu na rouspících. Jako testovaná imunotoxická látka byl zvolen chlorid nikelnatý na základě publikace od autorů Sauvé a kol. [82]. Nejprve byl proveden předběžný test a následně test limitní, kterým se určilo, kde přibližně se nachází EC₅₀. Poslední byl nasazen definitivní test ve dvojím uspořádání – jeden pro potvrzení EC₅₀ a druhý pro stanovení NOEC. Pro potvrzení EC₅₀ byly nasazeny testy do skleněných 25ml kádinek o koncentracích 4,4; 4,5; 4,7; 4,9; 5; 5,5; 6,5; 7,5; 10 mg/l. Pro stanovení NOEC byly nasazeny dospělé rouspice do skleněných 25ml kádinek o koncentracích 1; 2,5; 3,5; 4,2; 4,4 mg/l., včetně kontrolního vzorků, jenž obsahoval pouze rekonstituovanou vodu. Kvůli nízké koncentraci riboflavinu v rouspících byl potřeba tento test optimalizovat tak, aby bylo proměřeno a zachyceno detekovatelné množství fluorescence pomocí spektrofluorimetru. Pro test bylo zpracováno 100 kusů dospělých rouspic na 0,5 ml HBSS. Na základě těchto výsledků byl optimalizován akvatický test a to tak, že do každé 25ml skleněné kádinky o 4 replikách bylo vloženo 25 dospělých rouspic tak, aby výsledný počet dospělých rouspic pro jednu testovanou koncentraci činil 100. Akutní test vodní toxicity probíhal 72 hodin ve tmě při (19 ± 2) °C. Po tomto čase byly všechny typy testů následně zpracovány optimalizovanými extruzními metodami – ultrazvukovou vodní lázní a homogenizátorem dle postupů uvedených v kapitole a podkapitole 3.5.1 a 3.5.2. Zpracované vzorky byly použity pro spočítání počtu živých coelomocytových buněk rouspic na Bürkerově komůrce. Dále byly zpracované vzorky použity pro další měření na spektrofluorimetru a na průtokovém cytometru.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

V této diplomové práci byly zvoleny různé extruzní metody pro izolaci a identifikaci buněk coelomocytů z organismu *Enchytraeus crypticus*. Nejdříve byla provedena analýza buněk coelomocytů se snahou identifikovat, zda jsou tyto buňky vhodné jako citlivé biomarkery imunotoxicity. Pro toto zjištění byla hodnocena funkční a strukturní aktivita fagocytů (coelomocytů), včetně jejich početních změn, po vystavení toxické látky (chloridem nikelnatým) v ekotoxikologickém testu. Tato práce byla inspirována článkem, ve kterém stanovovali toxicitu vybraných kovů a životaschopnost coelomocytů žížaly *E. fetida* [93].

Pro izolaci výše zmíněných buněk coelomu (coelomocytů) bylo potřeba vybrat vhodné extruzní postupy a optimalizovat je. Jednotlivé vybrané postupy byly již uvedené v podkapitole 1.4.2., kde byly zvoleny extruzní postupy pomocí etanolu, baterie a ultrazvuku. Metody izolace buněk byly vybrány na základě publikací od autorů Eyamble a kol. [77], kde popisovali extruzní postup za využití etanolu. Druhým způsobem extruze bylo použití elektrické baterie, které bylo popsáno ve studii od autorů Vernile a kol. [79]. Třetí metodou byla zvolena ultrazvuková vodní lázeň, která byla vybrána na základě článku od autorů Hendawi a kol. [81]. Jednotlivé metody byly v práci optimalizovány a následně hodnoceny a srovnávány mezi sebou za pomoci Bürkerovy komůrky.

V této práci byly pozorovány změny coelomocytů ve fluorescenčním a optickém mikroskopu, dále byly sledovány změny rozložení izolovaných buněčných populací na průtokovém cytometru a spektrofluorimetru. Tyto metody byly vybrány na základě publikací od autorů Bilej a kol. [96], v níž byla pozorována fagocytární aktivita coelomocytů žížal pomocí průtokového cytometru a Pytycz a kol. [97], v níž byl detekován spektrofluorimetricky riboflavin, který je přirozenou součástí granulocytů žížal.

4.1 Optimalizace extruze coelomocytů z dutiny coelomu

Pro následné testy byly vyzkoušeny všechny typy optimalizovaných extruzních metod (extruze etanolem, elektrickou a ultrazvukem). Hodnocení neúčinnější extruzní metody probíhalo v Bürkerově komůrce za pomoci methylenové modři. V této komůrce byly pozorovány dva typy buněk, granulární améboocyty a eleocyty, získané z extruzních metod z chovu roupic. Třetí typ buněk, hyalinní améboocyty, nebyly pozorovány, neboť se předpokládá, že tyto buňky natolik podléhají degradaci, že při běžném počítání na Bürkerově komůrce je nelze rozlišit. Při počítání v komůrce byl především kladen důraz na posouzení životaschopnosti těchto buněk. Pro potvrzení správnosti počtů byl test proveden z jednoho vzorku vždy ve dvojím uspořádání. Životaschopnost coelomocytů se zjišťovala po přidání methylenové modři.

Bylo zjištěno, že extruzní metoda za pomoci etanolu má jednu velkou nevýhodu a to tu, že je natolik invazivní, že způsobuje téměř 100% mortalitu pozorovaných buněk. Extruzní metoda za pomoci baterie má výhodu v tom, že je méně invazivní pro coelomocyty roupic, avšak její nevýhodou je, že z těl roupic unikne malé množství právě těchto buněk. Poslední a zároveň nejefektivnější je extruzní metoda za pomoci ultrazvukové vodní lázně. V následující Tabulce č. 9. je uveden počet živých/mrtvých druhů coelomocytů u všech typů extruzních metod.

Tabulka 9 – Počty průměrných živých/mrtvých buněk coelomu (po třech opakování) u jednotlivých extruzních metod.

Extruzní metoda	Počet buněk/ml								Celkový počet
	Granulární améboocyty				Eleocyty				
	Průměr živých	Průměr mrtvých	SD živých	SD mrtvých	Průměr živých	Průměr mrtvých	SD živých	SD mrtvých	
Ultrazvuk	293 333	124 444	8 889	17 778	88 889	97 778	17 778	8 889	604 444
Baterie	97 778	44 444	8 889	17 778	44 444	62 222	8 889	26 667	248 888
Etanol	44 444	115 556	8 889	8 889	26 667	97 778	8 889	8 889	71 111

Právě tato poslední extruzní metoda byla zvolena pro všechny následující testy. Na rozdíl od našich výsledků se způsobem extruze zabývali v publikaci od autorů Vernile a kol. [79], kde byla vyhodnocena jako nejlepší extruzní metoda coelomocytů žířal pomocí etanolu a nejnižší pak ultrazvuková extruze. V této diplomové práci nejnižší data poskytovala právě etanolová extruze a nejvyšší pak ta ultrazvuková. Nehledě na to, že u etanolové extruze byla většina buněk coelomu mrtvá. V jiné práci zase autoři Hendawi a kol. [81] potvrzují efekt ultrazvukové vodní lázně jako jednou z nejlepších extruzních metod, které nejen že poskytují vysokou výtěžnost coelomocytů, ale také popisují ekonomická pozitiva této metody.

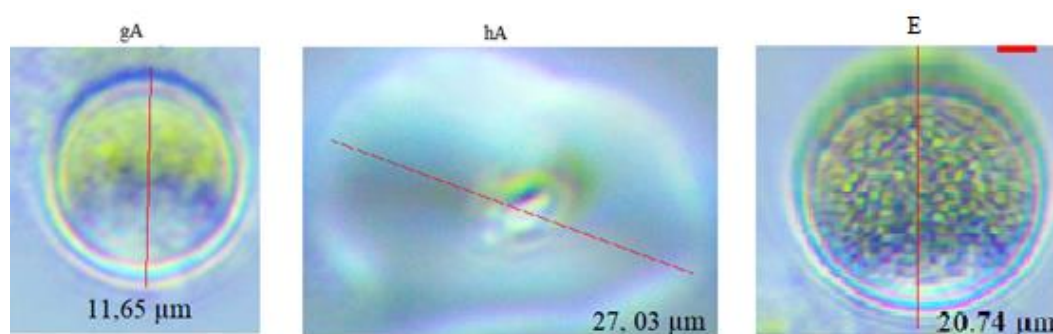
4.2 Analýza buněk v optickém a fluorescenčním mikroskopu

Extrudované buněčné suspenze byly hodnoceny v optickém mikroskopu ve světelném, ale i fázovém kontrastu. Stejně vzorky byly hodnoceny i ve fluorescenčním mikroskopu. V optickém mikroskopu byly bez předešlého obarvení pozorovány dva typy buněk – granulární améboocyty a eleocyty. Třetí typ buněk čili hyalinní améboocyty bylo potřeba pro jejich detekci nejdříve vizualizovat pomocí MGG barvení. Kurek a kol. [56] ve své práci pozorovali všechny druhy coelomocytů najednou. V této práci ovšem nebylo možné pozorovat všechny 3 typy buněk, což mohlo být zapříčiněno destrukcí, jak eleocytů, tak hyalinních améboocytů. V následující Tabulce č. 10. je popsána struktura coelomocytů dle studie od Kurek a kol. [56], ve které zkoumali všechny tři typy buněk v několika uspořádáních.

Tabulka 10 - Popis struktury coelomocytů, převzato a upraveno z [56].

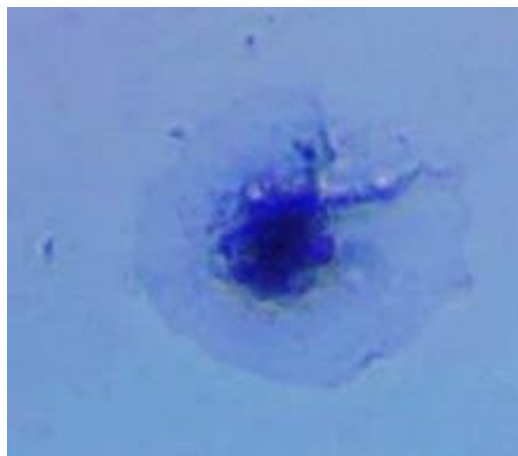
	Granulární améboocyty	Hyalinní améboocyty	Eleocyty
Optický mikroskop	Transparentní cytoplazma	-	Žlutohnědá granula
Fluorescence	-	-	Autofluorescenční granula
Fázový kontrast	Modrá granula	Halo efekt, modrá granula	Cytoplazma plná granulí
MGG barvení	Tavě modrá ledvinovitá jádra i granula	Tmavě modrá cytoplazma, tmavě modrá ledvinovitá jádra	Viditelná velká granula

Struktury jednotlivých typů coelomocytů, které byly pozorovány v optickém mikroskopu ve fázovém kontrastu můžeme pozorovat na Obrázku č. 13. Plochy těchto buněk byly měřeny pomocí doplňkové mikroskopické kamery.



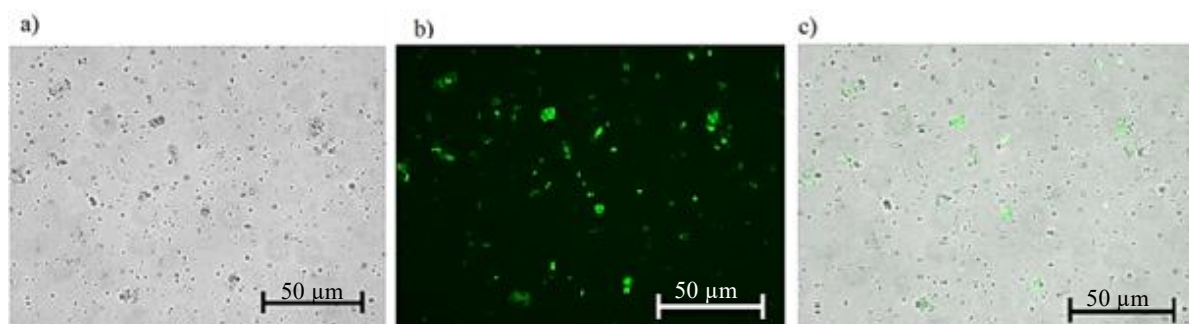
Obrázek 13 - Tři typy coelomocytů ve fázovém kontrastu v optickém mikroskopu, kde gA je granulární améboocyt; hA je hyalinní améboocyt a E je eleocyt.

Pro detekci hyalinních amébovců, byly buněčné suspenze vizualizovány pomocí MGG barvení. Obarvené hyalinní amébovcy dle MGG jsou znázorněny na Obrázku č.14.



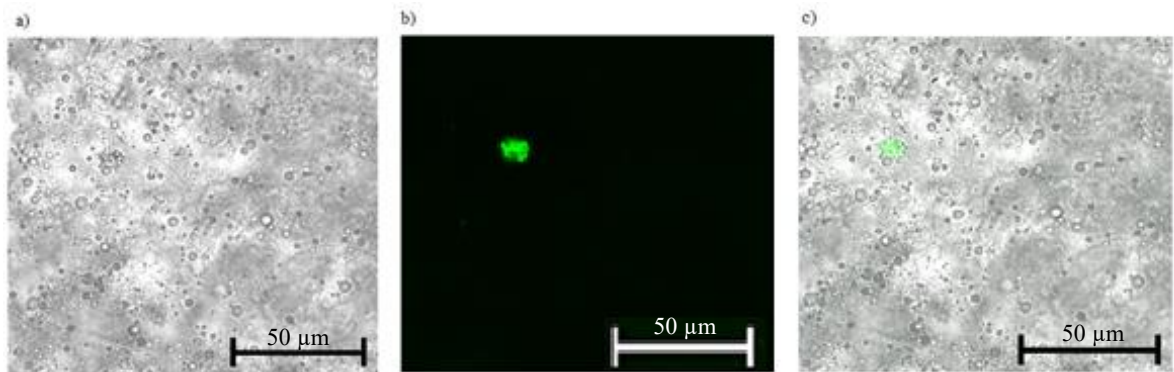
Obrázek 14 - Hyalinní amébovcy po MGG obarvení.

Pro fluorescenční mikroskop byly připraveny dva typy vzorků, jak homogenát tkáně roupic, tak i extrudované buněčné suspenze. Pro oba typy vzorků byly nasazeny následující koncentrace k (kontrolní vzorek), 4,2; 4,4; 5; 7,5; 10; 12 mg/l chloridu nikelnatého. Všechny koncentrace byly postupně hodnoceny ve fluorescenčním mikroskopu. Autofluorescence riboflavinu u buněčných suspenzí byla pozorována pouze u kontrolních vzorků. Se zvyšující se koncentrací exponované imunotoxické látky docházelo ke snižování fluorescence na takové množství, které již bylo srovnatelné s pozadím. Nízké odezvy fluorescence byly nepatrné už jen z toho důvodu, že roupice jsou velmi drobné organismy obsahující malé množství autofluorescenčního riboflavinu. Nalezené fluorescenční buňky, tj. eleocyty jsou znázorněny na Obrázku č. 15. Při hodnocení tohoto vzorku byla pozorována změna fluorescence a struktury eleocytů v čase. Pro oba typy vzorků byly získané reprezentativní fotky pořízeny a zpracovány pomocí softwaru NIS-Elements AR 5.11.03.



Obrázek 15 - Fluorescenční eleocyty v kontrolním vzorku, kde a) je fázový kontrast; b) autofluorescence; c) sloučení.

Vzorek homogenátu tkáně byl rovněž hodnocen za stejných podmínek. Odezva u tohoto typu vzorku byla nízká, jelikož v suspenzi je velké množství všech buněk obsažených v roupicích, včetně zbytků jejich tkání, které překrývají autofluorescenční eleocyty. V důsledku toho nebylo možné vyfotit více reprezentativních fotek z homogenátu tkáně roupic. Pro ilustraci můžeme vidět autofluorescenční eleocyt v homogenátu tkáně roupic na Obrázku č. 16.

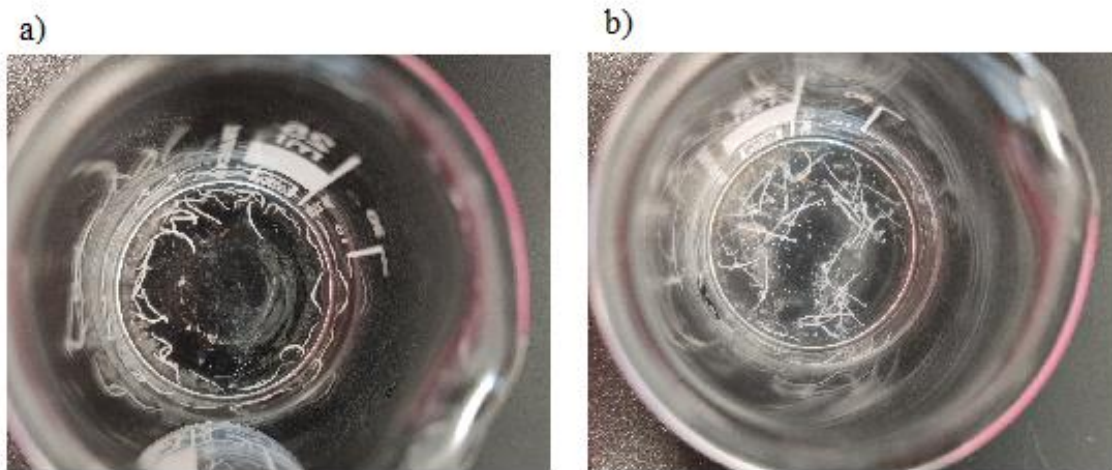


Obrázek 16 - Autofluorescenční eleocyt v homogenátu tkáně roupic, kde a) fázový kontrast; b) autofluorescence; c) sloučení.

V dostupné publikaci od autorů Linthicum a kol. [98] navíc byly ještě coelomocytové buňky žížaly *Lumbricus terrestris* studovány transmisní elektronovou mikroskopií. Pomocí této metody pozorovali autoři rovnou čtyři typy buněk – a to lymfocytární coelomocyty, granulocytární coelomocyty, chloragogenní buňky – eleocyty a coelomocyty, jenž obsahují četná inkluze. Pro případnou další práci na toto téma by bylo dobré vyzkoušet i stanovení buněk pomocí elektronové mikroskopie.

4.3 Test toxicity ve vodném prostředí

Tento test byl proveden ve více úrovních. Nejprve byl nasazen limitní test, který obsahoval kontrolní vzorek (rekonstituovanou vodu) a roztok NiCl_2 o koncentraci 100 mg/l. Vyhodnocení testu je znázorněno na Obrázku č. 17, kde je viditelná změna mezi kontrolou, v níž jsou živé rouspice a vysokou koncentrací toxické látky, ve které jsou mrtvé a nekompaktní rouspice.



Obrázek 17 - Vyhodnocení limitního testu, pod a) kontrolní vzorek obsahující rekonstituovanou vodu s 25 živými dospělými rouspicemi; b) vzorek obsahující 100 mg/l testované toxické látky (NiCl_2) se 100% mortalitou.

Druhý typ testu, tzv. předběžný test, zahrnoval široké rozpětí koncentrací v rozmezí 0,01; 0,1; 1; 10; 100 mg/l chloridu nikelnatého a kontrolního vzorku. Tento typ testu měl za cíl určit přibližnou koncentraci, u které přežije právě polovina nasazených dospělých rouspic čili EC_{50} . Výsledné průměrné hodnoty z měření počtů živých rouspic z celkového počtu 25 dospělých rouspic v jedné 25ml kádince je zaznamenán v Tabulce č. 10.

Tabulka 10 – Průměrné počty živých dospělých rouspic u předběžného testu (3 opakování testu).

Koncentrace (mg/l)	Počty živých rouspic z celkového počtu 25 dospělých rouspic na kádinku			
K (kontrola)	25	25	25	25
0,01	25	25	25	25
0,1	25	25	25	25
1	25	25	25	25
100	0	0	0	0

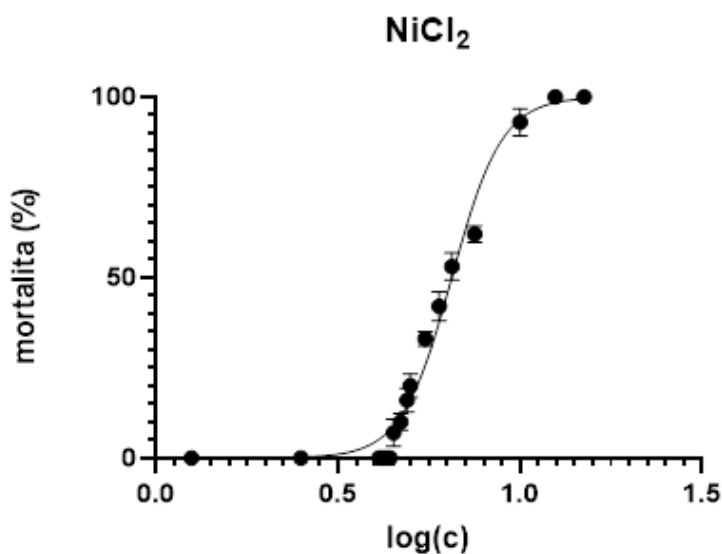
Poslední byly nasazeny dva typy definitivního testu – jeden pro potvrzení EC_{50} a jeden pro potvrzení výše koncentrace toxické látky, která nezpůsobuje žádnou mortalitu, ale měla by

vyvolávat odpověď na imunologické úrovni. Oba typy definitivních testů byly provedeny 3x, aby byla zajištěna opakovatelnost dosažených výsledků. Pro EC₅₀ byly nasazeny následující koncentrace v rozmezí 1,25-12,5 mg/l chloridu nikelnatého a kontrolní vzorek obsahující rekonstituovanou vodu. Nasazení vodního testu je zobrazeno na Obrázku č. 18.



Obrázek 18 – Nasazení definitivního ekotoxikologického testu do 25ml skleněných kádinek.

Získaná data z ekotoxikologického testu byla vyhodnocena prostřednictvím statistického programu GraphPad Prism s využitím lineární regrese stanovena hodnota 72hEC₅₀ pro chlorid nikelnatý u koncentrace 6,5 mg/l s rovnicí regrese 0,9804. Takovéto vyhodnocení je zobrazeno na Grafu č.1. Ve studii od autorů Yan a kol. [99] zkoumali pomocí půdních testů toxický efekt niklu v půdním prostředí na 13 druzích žížal. Tito autoři konkrétně zkoumali účinky niklu na růst a produkci kokonu a mláďat. Zjistili, že koncentrace inhibičního účinku (EC₅₀) se pohybovaly v rozmezí 169-684 mg/kg. V jiné práci od autorů Lock a kol. [100] stanovovali chronické působení niklu na 3 různé druhy bezobratlých. V této publikaci zjistili, že chronická toxicita niklu pro produkci kokonu u *E. fetida* činila po 21dEC₅₀ 362 mg Ni/kg. V této diplomové práci bylo zároveň pozorováno, že nejvyšší koncentrace chloridu nikelnatého, která ještě nezpůsobuje žádnou mortalitu bylo při 4,4 mg/l. Ve vyšších koncentracích testované látky byl pozorován úbytek živých roupic a již v koncentraci 10 mg/l toxické látky byly roupice téměř všechny mrtvé. Vyhodnocené výsledky jsou zobrazeny v Tabulce č. 11.



Graf 1 - Závislost mortality (%) na logaritmu koncentrace chloridu nikelnatého (zpracováno pomocí programu GraphPad Prism).

Tabulka 11 – Průměrné počty živých dospělých roupic u definitivního testu (3 opakování testu).

Koncentrace (mg/l)	Počty živých roupic z celkového počtu 25 dospělých roupic na kádinku			
K (kontrola)	25	25	25	25
5	21	19	20	20
5,5	17	17	16	17
6	15	15	13	15
6,5	11	13	11	12
7,5	9	10	10	9
10	1	2	1	1
12,5	0	0	0	0
15	0	0	0	0

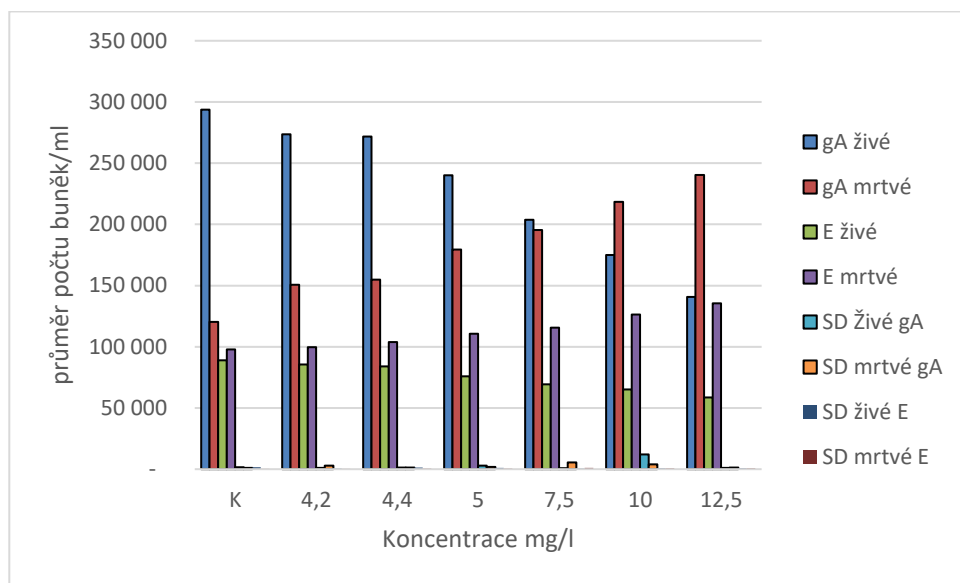
Pro potvrzení nulového efektu mortality a zjištění imunotoxicity této sloučeniny byly nasazeny následující koncentrace 4; 4,1; 4,2; 4,3; 4,4; 4,5 mg/l chloridu nikelnatého a kontrolní vzorek, který obsahoval rekonstituovanou vodu. Opakované nasazení testů odhalilo, že v koncentraci 4,2 mg/l se ve větší míře projevuje mírné poškození imunitního systému roupic. Dále bylo potvrzeno, že v koncentraci 4,5 mg/l začínají rousice umírat. Vyhodnocené počty živých roupic, z celkového počtu 25 dospělých roupic na 25ml kádinku, je zobrazeno v Tabulce č. 12.

Tabulka 12 – Průměrné počty živých rousic pro potvrzení imunotoxicity a nulového efektu mortality (3 opakování testu).

Koncentrace (mg/l)	Počty živých rousic z celkového počtu 25 rousic na kádinku			
K (kontrola)	25	25	25	25
4,1	25	25	25	25
4,2	25	25	25	25
4,3	25	25	25	25
4,4	25	25	25	25
4,5	24	24	23	25

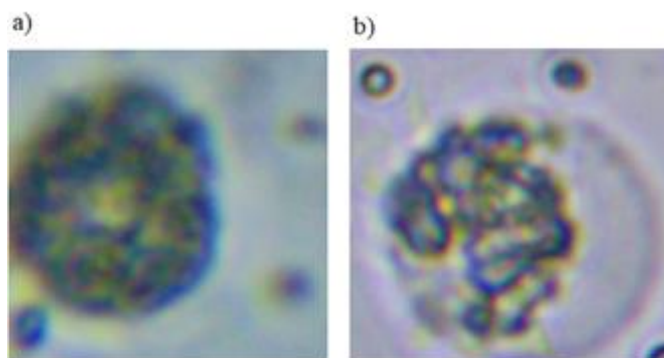
4.4 Počítání buněk v Bürkerově komůrce

Počítání na Bürkerově komůrce bylo použito jako další metoda k ověření počtu buněk coelomu po expozici rouspic toxickou látkou. Stejně jako u předchozích metod byly hodnoceny následující koncentrace - k (kontrolní vzorek obsahující rekonstituovanou vodu); 4,2; 4,4; 5; 7,5; 10; 12,5 mg/l chloridu nikelnatého. Již v nejnižší koncentraci chloridu nikelnatého byl pozorován úbytek životaschopných buněk, který se s vyšší koncentrací imunotoxické látky snižoval. Přehled získaných počtů živých/mrtvých coelomocytů pro jednotlivé koncentrace je uveden v Grafu č. 3.



Graf 2 – Srovnání průměrných počtů živých/mrtvých buněk coelomu (získané ze čtyř opakování) pro jednotlivé koncentrace, kde gA je granulární améboцит a E je eleocyt

Dále bylo pozorováno, že působením chloridu nikelnatého dochází k destrukci jednotlivých buněk coelomu. Největší změny byly pozorovány u eleocytů, u nichž docházelo k postupnému vypuzování jejich granul. Takovýto polorozpadlý eleocyt je znázorněn na Obrázku č. 19.

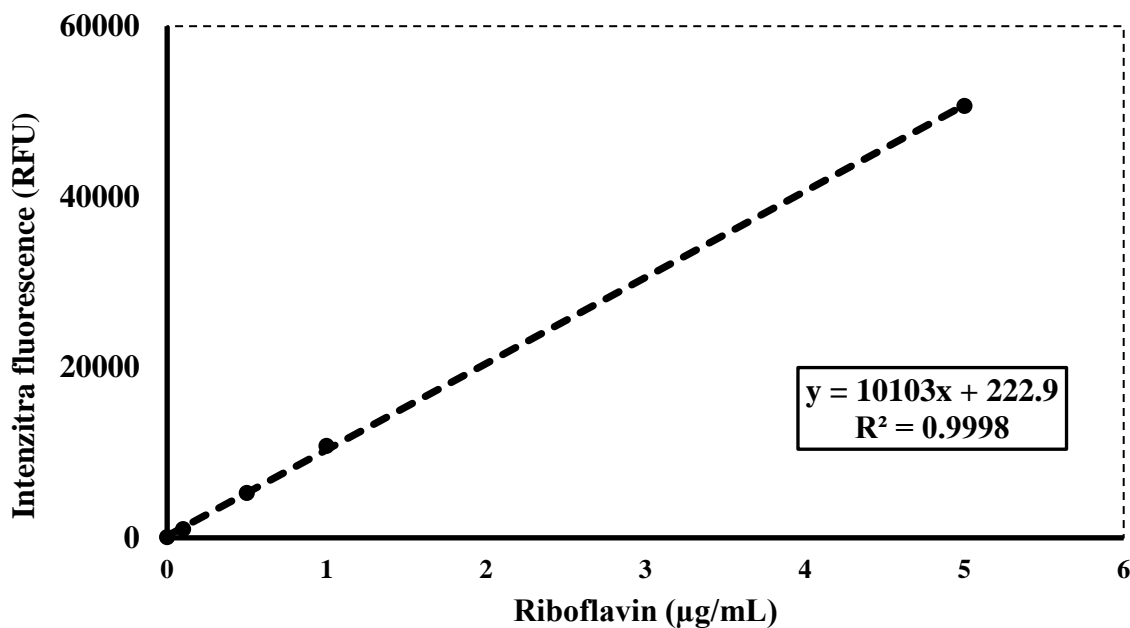


Obrázek 19 – Srovnání dvou eleocytů, kde a) kompletní eleocyt, b) polorozpadlý eleocyt.

Při vyšších koncentracích chloridu nikelnatého je pozorována nižší životaschopnost buněk. Ty podléhají destrukci natolik, že ve většině případů ztrácí svůj tvar i granula, a tudíž je pouhým okem není možné ve velké míře správně detekovat. Proto byl pozorován úbytek buněk při vyšších koncentracích testované látky, jelikož hodnocení coelomocytů bylo hodně subjektivní. V publikaci od autorů Homa kol. [101] stanovovali účinek těžkých kovů na imunitní systém kroužkovců. Tito autoři zjistili, že roztoky těžkých kovů působí na každý druh testovaného organismu jinak. Například u jednoho druhu žížal *Allolobophora chlorotica* byl pozorován pokles riboflavinu. Zatímco u jiného druhu žížal *E. andrei* byl pozorován opačný efekt, tudíž nárůst celkového obsahu riboflavinu obsaženého v eleocytech. Tato publikace prokazuje rozdílnou vnímavost mezi jednotlivými druhy testovaných organismů. V této diplomové práci byl pozorován úbytek jednotlivých buněk coelomu oproti již zmíněné publikaci. Rozdíl mohl být v zásadě výběru testovaného organismu, kdy ve výše zmíněné publikaci testy prováděli na organismu žížal (*E. andrei*). Dalším rozdílem bylo jakým způsobem byly jednotlivé organismy uchovány, jaké koncentrace toxických látek byly použity a proces zpracování.

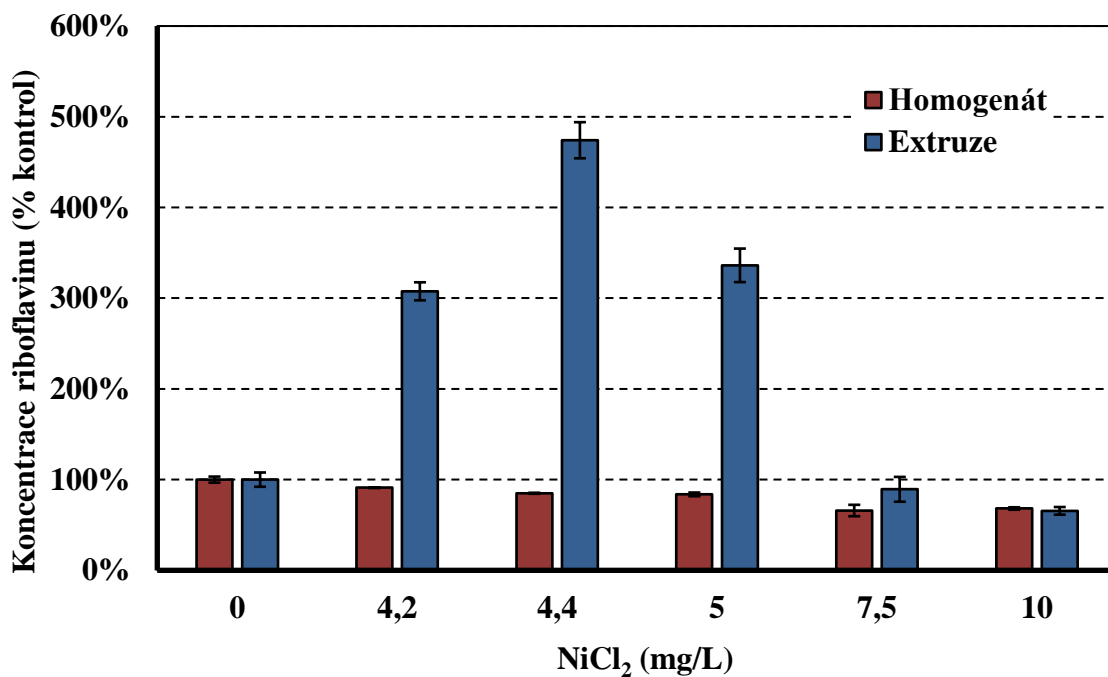
4.5 Fluorimetrické sledování obsahu riboflavinu v eleocytech

Na spektrofluorimetru byly měřeny dva typy vzorků – buněčná suspenze a homogenát tkáně roupic. Oba typy vzorků byly nasazeny při stejných koncentracích a vždy minimálně dvakrát proměřeny. Koncentrace použité v testu byly v rozmezí k (kontrola); 4,2; 4,4; 5; 7,5; 10; 12,5 mg/l NiCl₂. Imunotoxicita u roupic spočívá ve vyšší obraně imunitních buněk, tj. coelomocytů – především eleocytů, oproti toxické látce. Eleocyty svou obranyschopností vydávají z buněk větší množství riboflavinu, který má schopnost autofluorescence. A právě autofluorescence byla jediným ze stanovovaných faktorů. V této práci u buněčné suspenze data činila nárůst fluorescence při 4,2 mg/l chloridu nikelnatého. Tato fluorescence postupně klesala se zvyšující se koncentrací chloridu nikelnatého. V kontrole odezva byla nízká. Tento účinek mohl být dán tím, že v kontrole nejsou roupace vystavené žádné toxické látce tudíž se jejich organismus nemusí proti ničemu bránit. Dalším důvodem mohlo být, že zpracováním roupic pomocí ultrazvukové vodní lázně nemuselo být pro ně dostatečně stresující. Proto nemuselo dojít k velkému vyloučení coelomocytových buněk do roztoku HBSS. Za to u homogenátu byla pozorována mnohem větší množství fluorescence v důsledku toho, že suspenze byla tvořena z celé tkáně těla roupic, přičemž roupace sami o sobě mají velkou schopnost autofluorescence. Proto u dat získaných proměřením homogenátu tkáně roupic byly odezvy fluorescence větší než u buněčných suspenzí, kde byly pouze coelomocyty, z nichž svítí jen eleocyty. Pro statistické zpracování a správné vyhodnocení bylo třeba vztáhnout množství fluorescence naměřené ve vzorcích ke kalibrační řadě o různých koncentracích riboflavinu. Takovéto zpracování je viděno na Grafu č. 4.



Graf 3 – Kalibrační křivka riboflavinu vztažená k naměřeným fluorescencím ze vzorků (data získaná ze tří opakování).

Výsledná data stanovení riboflavinu ve vzorcích homogenátu tkáně roupic a extrudovaných buněčných suspenzí jsou znázorněna na grafu č. 5.



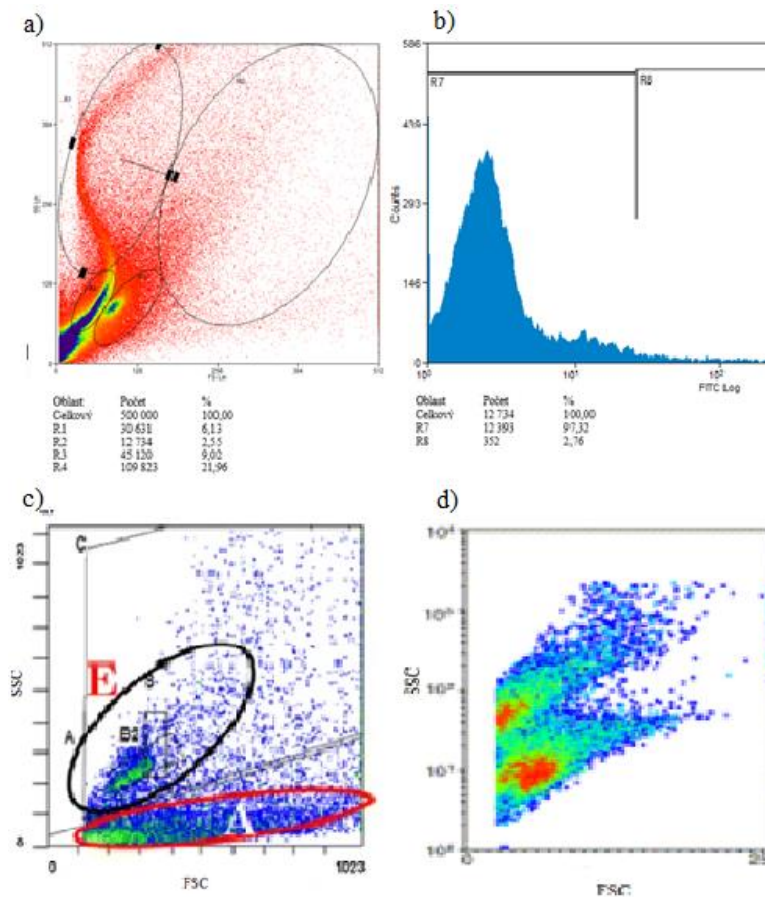
Graf 4 – Výsledná data (získaná ze tří opakování) množství fluorescence ve vzorcích extruze a homogenátu vztažená k %CTRL.

Autoři Lijie Du a kol. [91] a Plytycz a kol. [97] ve své práci zkoumali efekt těžkých kovů na organismus žížal v půdním prostředí. Po ekotoxikologických testech prováděných v půdě a jejich následném spektrofluorimetrickém proměření zjistili, že u červů, jenž pobývají v neznečištěné půdě, je obsah autofluorescenčního riboflavinu vyšší oproti červům, kteří byli chováni v znečištěné půdě obsahující Ni/Cu nebo Zn/Pb. V těchto publikacích používali extrudované vzorky pomocí elektrického vytlačování. V této diplomové práci byly využity pro měření extrudované vzorky pomocí ultrazvukové vodní lázně a následně i homogenát tkáně roupice získaný pomocí ručního homogenizátoru. Další odlišností bylo, že zvolený testovaný organismus roupice byl nasazen do vodního ekotoxikologického testu. V této práci bylo v jednom z testů prokázáno, že extrudované buňky coelomu roupice v kontrolním vzorku, ve kterém byla pouze rekonstituovaná voda, má nižší výtěžnost fluorescence oproti koncentracím s toxickou látkou. Tento účinek mohl vzniknout tím, že roupice v kontrolním vzorku nejsou ničím stresovány, tudíž vyplavení autofluorescenčního riboflavinu není v takové míře detekovatelné. Při koncentraci 4,2 a 4,4 mg/l již byla detekovatelná větší fluorescence, jelikož roupice při těchto koncentracích ještě plně přežívají, ale už dochází k imunologickým změnám. To se projeví jako nárůst fluorescence v důsledku většího vydávání riboflavinu z organismu roupice. V druhém testu byl proměřený homogenát tkáně roupice, jenž vykazoval největší hodnotu fluorescence v kontrolním vzorku oproti jiným nasazeným koncentracím. Dle nárůstu koncentrace toxické látky, klesalo množství naměřené fluorescence. Z ekotoxikologického testu byla zaznamenána úmrtnost roupice od koncentrace 4,5 mg/l, proto naměřený úbytek fluorescence u koncentrace 5 mg/l již lze odůvodnit postupnou mortalitou testovacího organismu.

Analýza na průtokovém cytometru

Životaschopnost buněk coelomocytů byla monitorována pomocí průtokové cytometrie v řadě publikací. Všechny dostupné publikace využívaly ve většině případů jako modelový organismus žížaly. Cílem tohoto experimentu bylo vždy detekovat buňky coelomu a následně provést jejich identifikaci pomocí fluorescence buněk (eleocytů/chloragocytů) [56]. Ve všech publikacích byli schopni rozlišit alespoň dva druhy buněk – amébocyty a eleocyty. Právě eleocyty jako jediné buňky obsahují ve svých granulích riboflavin. Proto jen eleocyty poskytují fluorescenční odpověď. Všechny typy buněk se liší svou velikostí, granularitou a fluorescenční barvitelností [81].

Cílem analýz na průtokovém cytometru bylo ověřit vhodnost metody pro imunotoxické hodnocení vlivu látek na coelomocyty. Pro analýzy byly připraveny buněčné suspenze extrudované pomocí ultrazvukové vodní lázně. Pilotní analýzy suspenze buněk s průtokovým cytometrem vycházely z hodnocení analýz v práci autorů Irizar a kol. [93] a Hendawi a kol. [81]. V následujícím Obrázku č. 20a, b je zobrazena analýza kontrolního vzorku bez ovlivnění toxickou látkou a srovnána s výše uvedenými pracemi. Izolované buňky byly hodnoceny podle své granularity (SSC) a velikosti (FSC). Při hodnocení se dbalo i na vhodné označení jednotlivých subpopulací tak, aby nedocházelo k překryvu detekovaných buněčných populací. Ve výsledku nebyly zcela oddělené populace buněk, ale byl prokázán výskyt malých buněk s nízkým FSC i SSC, pravděpodobně by se mohlo jednat o amébocyty. V práci Irizar a kol. [93] taktéž hodnotili amébocyty jako malé buňky s nízkou granularitou. Dále byly detekovány velké buňky s vysokým SSC a nízkým FSC, pravděpodobně by se mohlo jednat o eleocyty. Ve studii od Hendawi a kol. [81] taktéž detekovali eleocyty jako buňky s vysokým obsahem granulí. V obou výše zmíněných člancích detekovaly minimálně dvě populace buněk podle vnitřní granularity (SSC) a velikosti buněk (FSC). V článku od Hendawi a kol. [81] dokonce detekovali pomocí průtokového cytometru a světelného mikroskopu až 4 populace buněk podle jejich granularity, velikosti a barvitelnosti.



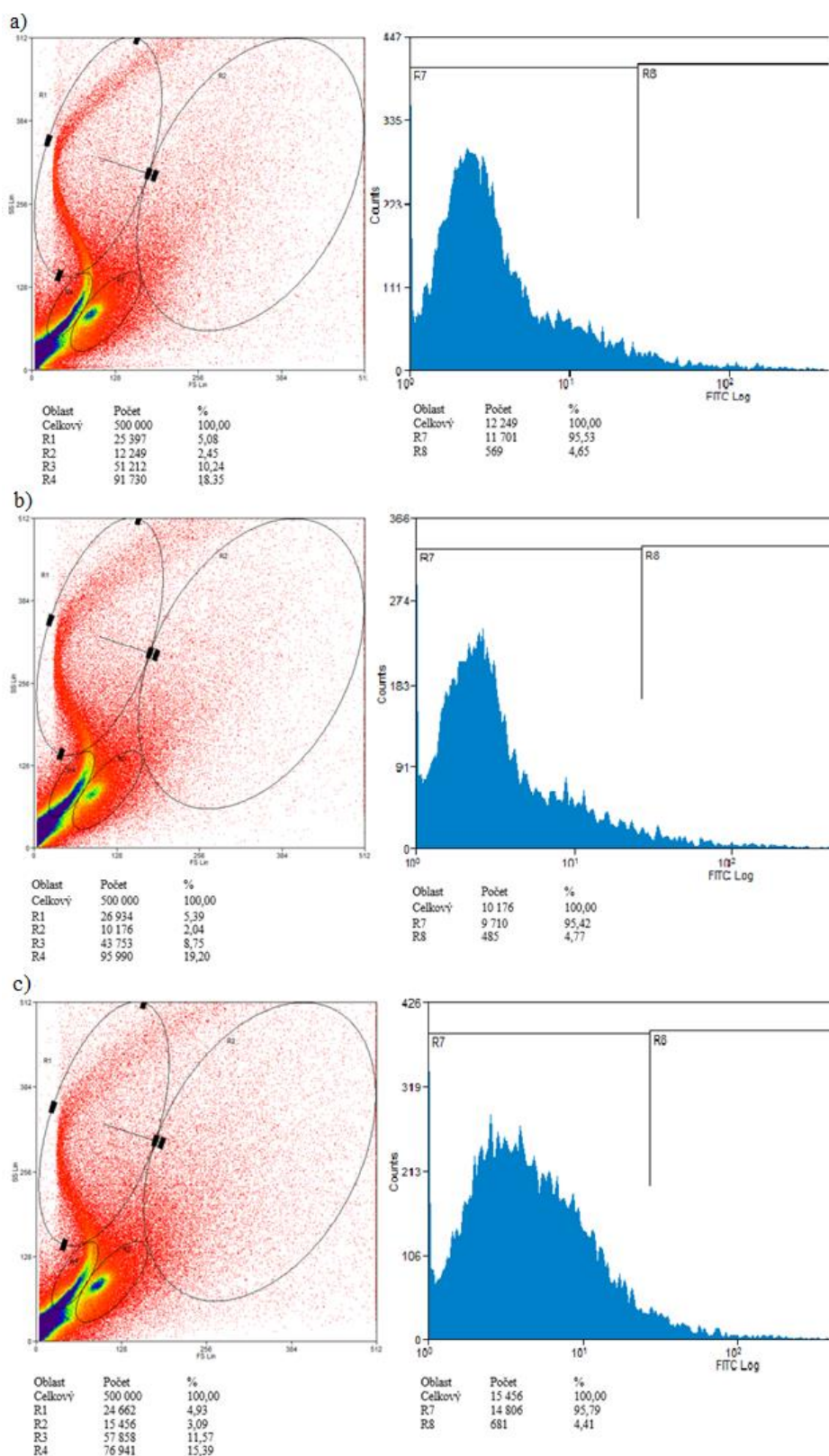
Obrázek 20 – Srovnání histogramů kontrolního vzorku coelomocytů, kde je a) kontrolní vzorek *E. crypticus* zpracovaný ultrazvukovou vodní lázní s označenými subpopulacemi R1 a R2 (horní část), u nichž by se pravděpodobně mohlo jednat o eleocyty a dále subpopulace R3 a R4 (dolní část), které by mohly být amébocyty (granulární a hyalinní); b) fluorescence kontrolního vzorku s oblastmi R7 a R8 z označené subpopulace R2 (vpravo nahore u Obr. 20a); c) kontrolní vzorek *E. fetida* s označenými subpopulacemi E (eleocyty) A (amébocyty) ze studie [93]; d) kontrolní vzorek zpracovaný ultrazvukovou extruzní metodou ze studie [81]

Pro správné rozlišení populací buněk amébocytů a eleocytů, případně hyalinních buněk, by bylo vhodné navrhnout analýzu s nějakou značící látkou (např. protilátkou proti specifickému antigenu) proti jedné z populací. Jinou možností pro lepší orientaci v získaných histogramech by mohlo být použití standardních latexových kuliček se známou velikostí. S těmito pilotními výsledky se ukázaly další možné kroky v analýzách.

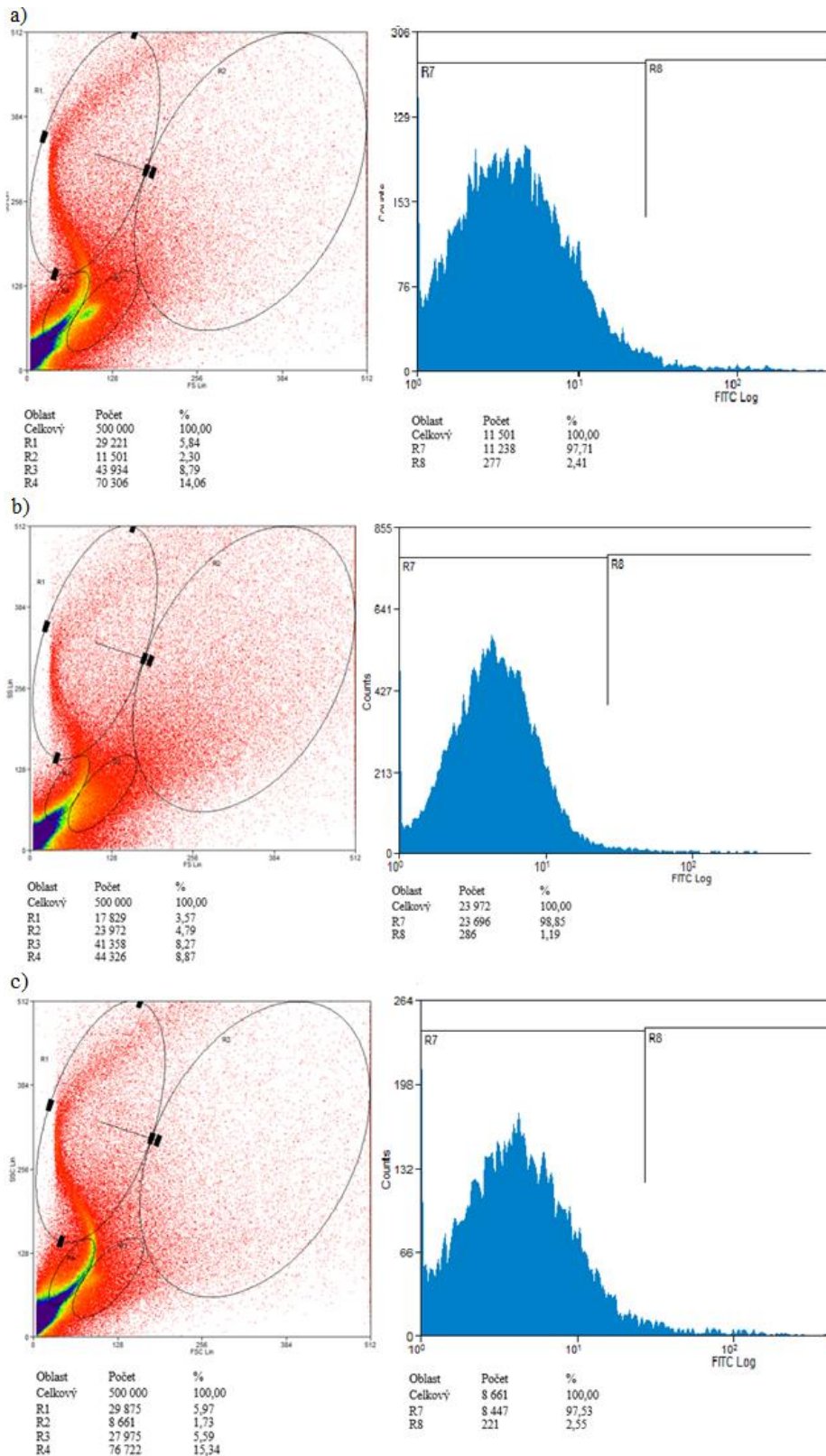
Dále byly z analýz hodnoceny změny v buněčných suspenzích získaných z nasazeného ekotoxikologického testu o těchto koncentracích 4,2; 4,4; 5; 7,5; 10; 12,5 mg/l NiCl₂ proti kontrole (Obr. 20a). Z každé koncentrace byly převedeny 2 ml vzorku do speciálních plastových zkumavek určených pro měření na průtokovém cytometru. Na následujících Obrázcích č. 21 a 22 jsou výsledné histogramy extrudovaných buněk ze vzorků po ovlivnění roupic s NiCl₂. Na základě změn v rozložení buněk a změn relativního počtu zastoupení extrudovaných buněk u kontrolního vzorku a vzorků po ovlivnění bylo možné potvrdit

imunotoxický efekt chloridu nikelnatého. Tato tvrzení byla podložena na základě studie od autorů Sauvé a kol. [82]. Úbytek označených buněk (subpopulace R1, R2, R3, R4) by mohl značit pro jejich mortalitu. Ta by však musela být potvrzená například pomocí propidium jodidu. Postupné ztráty životaschopných buněk byly v této práci prokázány pomocí Bürkerovy komůrky. Všechny níže uvedené obrázky obsahují stejně označené (v gatech) subpopulace buněk, tudíž je možné pozorovat vliv chloridu nikelnatého na coelomocyty. Vysvětlivky označení subpopulací jsou uvedeny v popisku obrázku. U všech analýz byl proměřen přibližně stejný počet buněk (500 000) za stejných podmínek.

S ohledem na detekci fluorescence buněk eleocytů byl hodnocen pouze Gate 2 (Obr. 20b, 21a,b,c a 22a,b,c vpravo) s přibližně 10 000 buněk, který vykazoval nejvyšší míru fluorescence. Fluorescence kontrolního vzorku byla zobrazena ve formě souvislého a úzkého prvního píku. Se zvyšující se koncentrací chloridu nikelnatého postupně docházelo ke změnám detekované fluorescence eleocytů, jenž se projeví v rozprostření a tvaru převážně prvního píku oproti kontrolnímu vzorku. Již při koncentraci 4,2 mg/l NiCl_2 byla pozorována začínající změna v rozložení, kdy první pík přestává být celistvým. Při dalších zvyšujících se koncentracích NiCl_2 byl první pík více rozložen do šířky, a nikoliv do výšky. Všechny výsledky získané pomocí průtokové cytometrie jsou pouze pilotního charakteru.



Obrázek 21 – Pilotní histogramy počtů buněk z ekotoxikologického testu, kde jsou a) buňky v koncentraci 4,2 mg/l NiCl₂ se „zagetovanými“ populacemi – R1 a R2 (horní dvě oblasti) by mohly být pravděpodobně eococyty lišící se jen svou velikostí, R3 a R4 (dolní dvě oblasti) by mohly být hyalinní a granulózní améboocyty, v druhé části obrázku (vpravo) je vybraná fluorescence (R7, R8) pro označené R2 buňky (vpravo nahoře); b) koncentrace 4,4 mg/l NiCl₂ se svou fluorescencí; c) koncentrace 5 mg/l NiCl₂ se svou fluorescencí.



Obrázek 22 – Pilotní histogramy počtů buněk z ekotoxikologického testu, kde jsou a) buňky v koncentraci 7,5 mg/l NiCl₂ se „zagetovanými“ populacemi – R1 a R2 (horní dvě oblasti) by mohly být pravděpodobně eococyty lišící se jen svou velikostí, R3 a R4 (dolní dvě oblasti) by mohly být hyalinní a granulární améboocyty, v druhé části obrázku (vpravo) je vybraná fluorescence (R7, R8) pro označené R2 buňky (vpravo nahoře); b) koncentrace 10 mg/l NiCl₂ se svou fluorescencí; c) koncentrace 12,55 mg/l NiCl₂ se svou fluorescencí.

Při hodnocení histogramů (fluorescenční graf – oblast R8) bylo zjištěno, že u koncentrace 4,2 a 4,4 mg/l NiCl₂ byla naměřená fluorescence eleocytů větší oproti kontrole. U kontrolního vzorku bylo pozorováno pouze 2,76 % buněk se schopností autofluorescence. Pro koncentraci 4,2 mg/l toxické látky byla pozorována fluorescence u 4,65 % buněk a pro koncentraci 4,4 mg/l byla zaznamenána fluorescence u 4,77 % eleocytů. Nárůst fluorescence by mohl být dán tím, že roupice po expozici toxické látky se ve snaze bránit produkují větší množství riboflavinu, který má autofluorescenční schopnost. Stejný trend získaných výsledků byl naměřen u spektrofluorimetru. Naproti tomu ve studii od autorů Podolak a kol. [102] mimo jiné zkoumali účinek kontaminované půdy niklem, olovem a zinkem na organismus žížal pomocí průtokové cytometrie. Zjistili, že fluorescence naměřená v kontrolních vzorcích je vyšší oproti kontaminovaným vzorkům. Pilotní data získaná proměřením vzorků pomocí průtokové cytometrie se lišila oproti výše zmíněné publikaci. Jiné výsledky mohly být dány už jen výběrem jiného testovaného organismu, avšak pro správné hodnocení by bylo třeba proměřit více vzorků a provést statistické hodnocení. Dále bylo v této diplomové práci zjištěno, že při koncentraci 5 mg/l NiCl₂, již docházelo k mortalitě roupic tudíž i k úbytku životaschopných buněk. Toto tvrzení bylo potvrzeno pomocí Bürkerovy komůrky. Vzhledem k úbytku životaschopných buněk, hlavně eleocytů obsahujících riboflavin, byl pozorován pokles fluorescence oproti předchozím koncentracím, která činila 4,41 % eleocytů. Ve srovnání s kontrolním vzorkem, byla naměřená fluorescence stále vyšší, což může být zapříčiněno větší produkcí riboflavinu po expozici toxickou látkou. Při dalších koncentracích fluorescence i počet naměřených buněk pozvolna klesala. Při koncentraci 7,5 mg/l NiCl₂ bylo detekováno 2,41 % autofluorescenčních eleocytů a při koncentraci 10 mg/l NiCl₂ bylo detekováno pouze 1,19 eleocytů. Jak již bylo zmíněno výše, tak eleocyty jako jediné buňky obsahují riboflavin ve svých granulích a se vzrůstající koncentrací toxické látky se rozpadají a ztrácejí na své síle.

V této práci byly sice zagatované 4 subpopulace, avšak se pravděpodobně jednalo jen o 3 typy buněk. Subpopulace označené jako R1 a R2 byly buňky o vysokém SSC, v obou případech by mohlo jít o eleocyty jen v jiných velikostech a s jiným obsahem granul. Pro subpopulaci R3 bylo předpokládáno, že se jedná o hyalinní amébocyty a buňky označené v subpopulaci R4 by pravděpodobně mohly být granulární amébocyty. V jiné publikaci od autorů Goven a kol. [103] byly popsány morfologické rozdíly coelomocytů. Bilej a kol. [96] zase popsali ve své práci rozdíly mezi buňkami, které mají vysokou a ty jenž mají nízkou fagocytární aktivitu.

4.6 Posouzení vhodnosti coelomocytů jako biomarkerů imunotoxicity

V této práci byly buňky coelomu hodnoceny řadou metod. Všechny analýzy byly propojené a poskytovaly kladné odezvy. Například pomocí optimalizovaných extruzních postupů a využití Bürkerovy komůrky byla stanovena ultrazvuková extruze jako nejefektivnější metoda, která průměrně poskytovala až 604 444 coelomocytů na 1 ml. Pro ostatní extruzní metody nebyla výtěžnost buněk v takové míře. Pro etanolovou extruzi bylo detekováno průměrně pouze 71 111 buněk coelomu na 1 ml. A pro elektrickou extruzi bylo průměrně detekováno 248 888 coelomocytů na 1 ml. Přehled jednotlivých počtů pro mrtvé/živé coelomocyty je zaznamenán v podkapitole 4.1. v Tabulce č. 9.

Dále byly coelomocyty z ekotoxikologického testu analyzovány v průtokovém cytometru, kde byly pozorovány tři subpopulace buněk. Mohlo by se jednat o granulární a hyalinní amébocyty a eleocyty. Tyto závěry byly navrženy podle studií, kde autoři zkoumali buňky coelomu žízal taktéž pomocí průtokové cytometrie. Dále byly tyto závěry potvrzeny pomocí stanovení počtu buněk v Bürkerově komůrce a také se spektrofluorimetrickou analýzou coelomocytů. Průtoková cytometrie byla úzce propojená s těmito metodami. Pomocí spektrofluorimetru byl detekován autofluorescenční riboflavin obsažený v granulích eleocytů. Ze získaných hodnot bylo patrné, že imunotoxická látka působí změny v imunitním systému roupic, jelikož při počátečních koncentracích vzrůstá odpovídavost organismu. Za to při vysokých koncentracích dochází k mortalitě buněk, tudíž i k vyčerpání organismu o obranné mechanismy mimo jiné i v podobně riboflavinu. Mortalita buněk je potvrzena pomocí Bürkerovy komůrky. V ní bylo detekováno že k prvním náznakům úbytku životaschopných buněk dochází již při koncentraci 4,5 mg/l. Pomocí Bürkerovy komůrky bylo také zjištěno, že v kontrolním vzorku se nachází přibližně pod 300 000 živých granulárních améboctů na 1 ml vzorku a těsně pod 100 000 živých eleocytů na 1 ml vzorku. Se zvyšující se koncentrací počet buněk pozvolna klesal a již v koncentraci 12,5 mg/l bylo detekováno těsně pod 150 000 živých granulárních améboctů a okolo 60 000 živých eleocytů na 1 ml vzorku. Přehled průměrných hodnot pro živé/mrtvé coelomocyty je zaznamenán v Podkapitole 4.4. v Grafu č. 3.

Jak v průtokovém cytometru, tak i ve spektrofluorimetru byla detekována nejvyšší fluorescence při koncentraci 4,4 mg/l NiCl_2 . Při vyšších koncentracích u obou metod pozvolna fluorescence klesala. Pro spektrofluorimetrické hodnocení bylo důležité i odlišit změnu vůči buněčným extrudovaným suspenzím a homogenátu tkáně roupic. Pro kontrolní vzorek buněčných suspenzí byla odezva fluorescence nízká oproti koncentracím 4,2 mg/l a 4,4 mg/l. Při vyšších koncentracích fluorescence klesala i pod úroveň kontrolního vzorku. Pro homogenát tkáně

roupic byl zjištěn jiný účinek, kdy kontrolní vzorek poskytoval největší fluorescenční odezvu. Při zvyšujících se koncentracích pozvolna fluorescence klesala. Rozdíl mezi těmito vzorky byl dán tím, že u extrudovaných buněčných suspenzí byly měřeny pouze eococyty, jenž obsahují autofluorescenční riboflavin. Naproti tomu ve vzorcích homogenátu byl proměřen veškerý obsah těl roupic. Přehled statistického vyhodnocení dat je zaznamenán v Podkapitole 4.5. v Grafu č. 5. Závěrem této podkapitoly lze coelomocyty označit za vhodné biomarkery imunotoxicity. To je již potvrzené v řadě studií, kde zkoumali různé kontaminanty vyskytující se v půdě na organismus žížal, respektive na jejich buňky coelomu.

5 ZÁVĚR

V této diplomové práci byly mezi sebou srovnávány jednotlivé optimalizované extruzní postupy. Jednalo se o extruzní metody chemického působení na roupice pomocí etanolu, elektrického vytlačování pomocí baterie a mechanického stresoru pomocí ultrazvukové vodní lázně. Pomocí stanovení počtu buněk v Bürkerově komůrce byla následně zvolena jako nejefektivnější extruzní metoda pomocí ultrazvukové vodní lázně, jejíž data průměrně činila 604 444 coelomocytů na 1 ml. Tato metoda byla poté využita pro zpracování vzorků u jiných metod stanovení biomarkerů imunotoxicity.

Dalším dílčím krokem v této diplomové práci bylo stanovení míry imunotoxického působení vybrané toxické látky. Tou byl zvolen chlorid nikelnatý. Působení této látky bylo použito v ekotoxikologickém vodním testu. Principem testu bylo nasazení takového počtu dospělých roupic v testované látce o různých koncentracích po určitou dobu (72 hodin). Přičemž po této době by mělo být možné detekovat do jaké míry byl chlorid nikelnatý toxický pro imunitní systém roupic. Takováto detekce probíhala ve zpracovaných vzorcích ve formě buněčné suspenze nebo homogenátu tkáně roupic. Stanovení počtu buněk imunitního systému a množství riboflavinu bylo provedeno pomocí metody průtokové cytometrie, spektrofluorimetrie, optické a fluorescenční mikroskopie a Bürkerově komůrce.

Pomocí Bürkerovy komůrky bylo pozorováno, že se zvyšující se koncentrací chloridu nikelnatého dochází k úbytku buněk imunitního systému roupic a k jejich destrukci. Přehled průměrných hodnot pro živé/mrtvé coelomocyty je zaznamenán v Podkapitole 4.4. v Grafu č. 3.

Pomocí průtokového cytometru byly detekovány velké a malé buňky, přičemž by se mohlo jednat o 3 typy buněk – granulární a hyalinní amébocyty a eleocyty. Největší význam pro toto stanovení měly právě eleocyty, jelikož jen tyto buňky mají ve svých granulích obsažený autofluorescenční riboflavin, který byl detekován. Bylo zjištěno, že u kontrolního vzorku je pouze 2,76 % buněk, jež poskytují autofluorescenční odezvu. Nejvyšší fluorescenční odezva byla pozorována pro koncentraci 4,4 mg/l, jež vykazovala fluorescenci u 4,77 % buněk. Naopak tomu bylo u koncentrace 12,5 mg/l, kde byla pozorována fluorescence u 2,55 % buněk. Velký nárůst fluorescence byl nejspíše dán obranyschopností organismu roupic, kdy imunokompetentní buňky, respektive eleocyty, se brání proti toxické látce tak, že vylučují větší množství autofluorescenčního riboflavinu. Vitamín B2 neboli riboflavin je jedním z antioxidantů a podílí se na udržení stálého vnitřního prostředí nejenom u organismů kroužkoců.

Pomocí spektrofluorimetrické detekce byly proměřeny extrudované buněčné suspenze a vzorky homogenátu tkáně roupic *E.crypticus*, které byly nasazeny v různých koncentracích NiCl_2 . Proměřením všech vzorků se stanovovalo množství autofluorescenčního riboflavinu, jenž je součástí buněk eelocytů. Pro buněčné suspenze byla naměřena fluorescence nejvyšší v koncentraci 4,4 mg/l NiCl_2 a nejnižší pak v koncentraci 12,5 mg/l. Stejně naměřené fluorescence byly získány i analýzou na průtokovém cytometru. Pro homogenát tkáně roupic byla nejvyšší naměřená fluorescence pozorována v kontrolním vzorku a se vzrůstající koncentrací postupně fluorescence klesala. Rozdíl mezi těmito vzorky byl dán tím, že u extrudovaných buněčných suspenzí byly měřeny pouze eelocyty, jenž obsahují autofluorescenční riboflavin. Naproti tomu ve vzorcích homogenátu byl proměřen veškerý obsah těl roupic.

Byť jednotlivé použité metody pro stanovení citlivých biomarkerů imunotoxicity u organismu *E. crypticus* se v prvních fázích výzkumu osvědčily ve všech směrech, tak má tato práce i své úskalí. Pro tento malý organismus neexistuje mnoho studií a vzhledem k obsáhlé problematice nebyl prostor se více věnovat pouze jedné metodě. V příští práci by mohl být zapracován například na stanovení počtů subpopulací coelomocytů v průtokovém cytometru s následným využitím propidium jodidu nebo latexových kuliček o specifické velikosti pro přesnější detekci subpopulací coelomocytů a potvrzení mortality těchto buněk. V analýze průtokovou cytometrií je potřeba potvrdit výsledná pilotní data statistickým hodnocením u nejméně tří opakování každého vzorku. Dále bych doporučila sledování jednotlivých typů coelomocytů v elektronovém mikroskopu, pro lepší záchyt hyalinních amébocytů. V dalších pracích bych se spíše zaměřila na sledování buněk v průtokové cytometrii nebo ve spektrofluorimetru. Vhodná by byla i detekce lyzátu coelomocytů po přidání 2% Tritonu či jiného činidla.

6 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] WOLSKA, Lidia, Agnieszka SAGAJDAKOW, Agnieszka KUCZYŃSKA a Jacek NAMIEŚNIK. Application of ecotoxicological studies in integrated environmental monitoring: Possibilities and problems. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2007, **26**(4), 332-344. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2006.11.012
- [2] LYUBENOVA, Mariyana a Silvena BOTEVA. Biotests in Ecotoxicology: Current Practice and Problems. *Toxicology - New Aspects to This Scientific Conundrum*. InTech, 2016, 147-177. ISBN 978-953-51-2716-1. Dostupné z: doi:10.5772/64776
- [3] SCHLENK, Daniel. Necessity of Defining Biomarkers for Use in Ecological Risk Assessments. *Marine Pollution Bulletin* [online]. 1999, **39**(1-12), 48-53 [cit. 2023-01-11]. ISSN 0025326X. Dostupné z: doi:10.1016/S0025-326X(99)00015-6
- [4] MORIARTY, F. Ecotoxicology. *Human Toxicology*. 1988, **7**(5), 437-441. ISSN 0144-5952. Dostupné z: doi:10.1177/096032718800700510
- [5] ADAMS, S., John GIESY, Louis TREMBLAY a Charles EASON. The use of biomarkers in ecological risk assessment: recommendations from the Christchurch conference on Biomarkers in Ecotoxicology. *Biomarkers*. 2008, **6**(1), 1-6. ISSN 1354-750X. Dostupné z: doi:10.1080/135475001452724
- [6] TIMBRELL, John A. Biomarkers in toxicology. *Toxicology*. 1998, **129**(1), 1-12. ISSN 0300483X. Dostupné z: doi:10.1016/S0300-483X(98)00058-4
- [7] FRIJHOFF, Jeroen, Paul WINYARD, Neven ZARKOVIC et al. *Clinical Relevance of Biomarkers of Oxidative Stress*. 2015, **23**(14), 1144-1170. ISSN 1523-0864. Dostupné z: doi:10.1089/ars.2015.6317
- [8] BETTERIDGE, D. John. What is oxidative stress?. *Metabolism*. 2000, **49**(2), 3-8. ISSN 00260495. Dostupné z: doi:10.1016/S0026-0495(00)80077-3
- [9] MARROCCO, Ilaria, Fabio ALTIERI a Ilaria PELUSO. Measurement and Clinical Significance of Biomarkers of Oxidative Stress in Humans. *Oxidative Medicine and*

- Cellular Longevity*. 2017, **2017**, 1-32. ISSN 1942-0900. Dostupné z: doi:10.1155/2017/6501046
- [10] AHMED AMAR, Safa, Recep ERYILMAZ, Halit DEMIR, Serdar AYKAN a Canan DEMIR. Determination of oxidative stress levels and some antioxidant enzyme activities in prostate cancer. *The Aging Male*. 2019, **22**(3), 198-206. ISSN 1368-5538. Dostupné z: doi:10.1080/13685538.2018.1488955
- [11] GIL, Pedro, Fernando FARIÑAS, Angela CASADO a Encarnación LÓPEZ-FERNÁNDEZ. Malondialdehyde: A Possible Marker of Ageing. *Gerontology*. 2002, **48**(4), 209-214. ISSN 0304-324X. Dostupné z: doi:10.1159/000058352
- [12] WEI, Yau-Huei a Hsin-Chen LEE. Oxidative Stress, Mitochondrial DNA Mutation, and Impairment of Antioxidant Enzymes in Aging. *Experimental Biology and Medicine*. 2002, **227**(9), 671-682. ISSN 1535-3702. Dostupné z: doi:10.1177/153537020222700901
- [13] PAOLETTI, Francesco, Donatella ALDINUCCI, Alessandra MOCALI a Anna CAPARRINI. A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase activity in tissue extracts. *Analytical Biochemistry*. 1986, **154**(2), 536-541. ISSN 00032697. Dostupné z: doi:10.1016/0003-2697(86)90026-6
- [14] MATOUŠKOVÁ ET AL., Martina Matoušková. Antioxidační enzymy - biochemické markery oxidačního stresu. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies* [online]. 2014, **3**(3), 53-56 [cit. 2023-01-11]. Dostupné z: https://web2.mendelu.cz/af_239_nanotech/J_Met_Nano/0314/pdf/jmn3-13.pdf
- [15] DRAKE, J a R BALTZ. The Biochemistry of Mutagenesis. *Annual Review of Biochemistry*. 1976, **45**(1), 11-37. ISSN 0066-4154. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.bi.45.070176.000303
- [16] LIGHTNER, Jonathan a Timothy CASPAR. 14Seed Mutagenesis of Arabidopsis. *Arabidopsis Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press, 1998, **82**(14), 91-102. ISBN 978-0-89603-391-7. Dostupné z: doi:10.1385/0-89603-391-0:91

- [17] IKEHATA, Hironobu a Tetsuya ONO. The Mechanisms of UV Mutagenesis. *Journal of Radiation Research*. 2011, **52**(2), 115-125. ISSN 0449-3060. Dostupné z: doi:10.1269/jrr.10175
- [18] TEJS, Sebastian. *The Ames test: a methodological short review: Environmental Biotechnology*. In: . 2008, , s. 7-14.
- [19] KARKI, Gaurab. Ames test-a test for Mutagenicity: Principle, Procedure and Application. In: <https://www.onlinebiologynotes> [online]. 2017 [cit. 2023-01-11]. Dostupné z: <https://www.onlinebiologynotes.com/ames-test-a-test-for-mutagenicity-principle-procedure-and-application/>
- [20] HARBISON, Raymond D. Chemical-biological reactions common to teratogenesis and mutagenesis. *Environmental Health Perspectives*. 1978, **24**, 87-100. ISSN 0091-6765. Dostupné z: doi:10.1289/ehp.782487
- [21] ADIBI, Jennifer, Alexander LAYDEN, Rahel BIRRU et al. First trimester mechanisms of gestational sac placental and foetal teratogenicity: a framework for birth cohort studies. *Human Reproduction Update*. 2021, **27**(4), 747-770. ISSN 1355-4786. Dostupné z: doi:10.1093/humupd/dmaa063
- [22] PATEL, Seema a Sushree SANGEETA. Pesticides as the drivers of neuropsychotic diseases, cancers, and teratogenicity among agro-workers as well as general public. *Environmental Science and Pollution Research*. 2019, **26**(1), 91-100. ISSN 0944-1344. Dostupné z: doi:10.1007/s11356-018-3642-2
- [23] HEMMINKI, K. a P. VINEIS. Extrapolation of the evidence on teratogenicity of chemicals between humans and experimental animals: Chemicals other than drugs. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*. 1985, **5**(4), 251-289. ISSN 0270-3211. Dostupné z: doi:10.1002/tcm.1770050405
- [24] JAMKHANDE, Prasad, Kalyani CHINTAWAR a Prakash CHANDAK. Teratogenicity: a mechanism based short review on common teratogenic agents. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 2014, **4**(6), 421-432. ISSN 22221808. Dostupné z: doi:10.1016/S2222-1808(14)60600-9

- [25] AULTHOUSE, Amy a Daron HITT. The teratogenic effects of valproic acid in human chondrogenesis in vitro. *Teratology*. 1994, **49**(3), 208-217. ISSN 0040-3709. Dostupné z: doi:10.1002/tera.1420490317
- [26] *FTIR-Microspectroscopy Detection of Metronidazole Teratogenic Effects on Mice Fetus*. Iran J Pharm Res, 2014, . ISSN 1735-0328. Ashtarinezhad A, H Shirazi F, Vatanpour H, Mohamazadehasl B, Panahyab A, Nakhjavani M. PMID: 24711835; PMCID: PMC3977059.
- [27] SELGRADE, MaryJane K. Immunotoxicity—The Risk is Real. *Toxicological Sciences*. 2007, **100**(2), 328-332. ISSN 1096-6080. Dostupné z: doi:10.1093/toxsci/kfm244
- [28] DESCOTES, Jacques. Methods of evaluating immunotoxicity. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. 2006, **2**(2), 249-259. ISSN 1742-5255. Dostupné z: doi:10.1517/17425255.2.2.249
- [29] SHEN, P. Effects of cyanobacteria bloom extract on some parameters of immune function in mice. *Toxicology Letters*. 2003, **143**(1), 27-36. ISSN 03784274. Dostupné z: doi:10.1016/S0378-4274(03)00110-3
- [30] FRESHNEY, R. Ian. Culture of Animal Cells. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. 2005. Dostupné z: doi:10.1002/9780471747598
- [31] CUI, Zhisong, Xiao LUAN, Huichao JIANG et al. Application of a bacterial whole cell biosensor for the rapid detection of cytotoxicity in heavy metal contaminated seawater. *Chemosphere*. 2018, **200**(200), 322-329. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2018.02.097
- [32] PURSCHKE, G. On the ground pattern of Annelida. *Organisms Diversity & Evolution*. 2002, **2**(3), 181-196. ISSN 14396092. Dostupné z: doi:10.1078/1439-6092-00042
- [33] BRINKHURST, Ralph O.; GELDER, Stuart R. *Annelida: Oligochaeta. Ecology and classification of North American freshwater invertebrates, 1991, 401.*
- [34] Kroužkovci. In: *Biomach* [online]. 2005 [cit. 2023-01-11]. Dostupné z: <http://www.biomach.cz/biologie-zivocichua/krouzkovci>

- [35] WESTHEIDE, W. The direction of evolution within the Polychaeta. *Journal of Natural History*. 1997, **31**(1), 1-15. ISSN 0022-2933. Dostupné z: doi:10.1080/00222939700770011
- [36] ROSYPAL, Stanislav. *Nový přehled biologie*. První. Praha: Scientia, 2003. ISBN 80-718-3268-5.
- [37] PELOSI, Celine a Jörg RÖMBKE. Enchytraeids as bioindicators of land use and management. *Applied Soil Ecology*. 2018, **123**, 775-779. ISSN 09291393. Dostupné z: doi:10.1016/j.apsoil.2017.05.014
- [38] CASTRO-FERREIRA, Marta, Dick ROELOFS, Cornelis VAN GESTEL, Rudo VERWEIJ, Amadeu SOARES a Mónica AMORIM. Enchytraeus crypticus as model species in soil ecotoxicology. *Chemosphere*. 2012, **87**(11), 1222-1227. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2012.01.021
- [39] WESTHEIDE, W. a U. GRAEFE. Two new terrestrial Enchytraeus species (Oligochaeta, Annelida). *Journal of Natural History*. 1992, **26**(3), 479-488. ISSN 0022-2933. Dostupné z: doi:10.1080/00222939200770311
- [40] REYNOLDSON, T. B. ON THE LIFE-HISTORY AND ECOLOGY OF LUMBRICILLUS LINEATUS MULL. (OLIGOCHAETA). *Annals of Applied Biology*. 1939, **26**(4), 782-799. ISSN 0003-4746. Dostupné z: doi:10.1111/j.1744-7348.1939.tb06999.x
- [41] Testování ekotoxického vlivu POPs na půdní roupice (Enchytraeidae, Oligochaeta). In: <https://is.muni.cz/th/inl88/prilohy.pdf> [online]. Brno, 2004 [cit. 2023-01-11]. Dostupné z: <https://is.muni.cz/th/inl88/prilohy.pdf>
- [42] PARKIN, Jacqueline a Bryony COHEN. An overview of the immune system. *The Lancet*. 2001, **357**(9270), 1777-1789. ISSN 01406736. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(00)04904-7
- [43] CHAO, Dennis a Stephanie FORREST. Information Immune Systems. *Genetic Programming and Evolvable Machines*. 2003, **4**(4), 311-331. ISSN 13892576. Dostupné z: doi:10.1023/A:1026139027539

- [44] KREJSEK, Jan a Otakar KOPECKÝ. *Klinická imunologie*. 1. [Hradec Králové]: Nucleus HK, 2004. ISBN 80-862-2550-X.
- [45] GORDON, Siamon. Phagocytosis: An Immunobiologic Process. *Immunity*. 2016, **44**(3), 463-475. ISSN 10747613. Dostupné z: doi:10.1016/j.immuni.2016.02.026
- [46] FLANNAGAN, Ronald, Valentin JAUMOUILLE a Sergio GRINSTEIN. The Cell Biology of Phagocytosis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2012, **7**(1), 61-98. ISSN 1553-4006. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-pathol-011811-132445
- [47] RUSSELL, David G. Mycobacterium tuberculosis and the intimate discourse of a chronic infection. *Immunological Reviews*. 2011, **240**(1), 252-268. ISSN 01052896. Dostupné z: doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00984.x
- [48] MACKAY, Ian, Fred ROSEN, Peter DELVES a Ivan ROITT. The Immune System. *New England Journal of Medicine*. 2000, **343**(1), 37-49. ISSN 0028-4793. Dostupné z: doi:10.1056/NEJM200007063430107
- [49] NICHOLSON, Lindsay B. The immune system. *Essays in Biochemistry*. 2016, **60**(3), 275-301. ISSN 0071-1365. Dostupné z: doi:10.1042/EBC20160017
- [50] CASALI, P. a E. SCHETTINO. Structure and Function of Natural Antibodies. *Immunology of Silicones*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1996, **210**, 167-179. Current Topics in Microbiology and Immunology. ISBN 978-3-642-85228-2. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-642-85226-8_17
- [51] CHIU, Mark, Dennis GOULET, Alexey TEPLYAKOV a Gary GILLILAND. Antibody Structure and Function: The Basis for Engineering Therapeutics. *Antibodies*. 2019, **8**(4). ISSN 2073-4468. Dostupné z: doi:10.3390/antib8040055
- [52] FORTHAL, Donald, James CROWE JR., Diana BORASCHI a Rino RAPPUOLI. Functions of Antibodies. *Microbiology Spectrum*. 2014, **2**(4). ISSN 2165-0497. Dostupné z: doi:10.1128/microbiolspec.AID-0019-2014
- [53] CHEN, Kang, Giuliana MAGRI, Emilie GRASSET a Andrea CERUTTI. Rethinking mucosal antibody responses: IgM, IgG and IgD join IgA. *Nature Reviews Immunology*. 2020, **20**(7), 427-441. ISSN 1474-1733. Dostupné z: doi:10.1038/s41577-019-0261-1

- [54] YING, Xue-Ping, Xiao SUN, Hong-Xi WU, Hans-Uwe DAHMS, Supawadee CHULLASORN, Yong-Pu ZHANG, Yi-Jun HUANG a Wan-Xi YANG. The fine structure of coelomocytes in the sipunculid *Phascolosoma esculenta*. *Micron*. 2010, **41**(1), 71-78. ISSN 09684328. Dostupné z: doi:10.1016/j.micron.2009.08.006
- [55] ŠÍMA, P. Vývoj imunitních strategií v živočišné říši: Imunita jako součást integračních systémů organismu. *Živa*. 1997, **1997**(1), 25-123.
- [56] KUREK, Agata, Joanna HOMA, Ellen KAUSCHKE a Barbara PLYTYCZ. Characteristics of coelomocytes of the stubby earthworm, *Allolobophora chlorotica* (Sav.). *European Journal of Soil Biology*. 2007, **43**(1), 121-126. ISSN 11645563. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejsobi.2007.08.051
- [57] ADAMOWICZ, A. Morphology and ultrastructure of the earthworm *Dendrobaena veneta* (Lumbricidae) coelomocytes. *Tissue and Cell*. 2005, **37**(2), 125-133. ISSN 00408166. Dostupné z: doi:10.1016/j.tice.2004.11.002
- [58] *Morphology and phagocytotic activity of coelomocytes in Dendrobaena veneta (Lumbricidae)*. 2001, **46**(46). ISSN Zool. Pol.. 46.
- [59] CUSHING, John a David BORAKER. Some Specific Aspects of Cell-Surface Recognition by Sipunculid Coelomocytes. *Immunologic Phylogeny*. Boston, MA: Springer US, 1975, (64), 35-44. Advances in Experimental Medicine and Biology. ISBN 978-1-4684-3263-3. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4684-3261-9_5
- [60] TAHSEEN, Qudsia. Coelomocytes: Biology and Possible Immune Functions in Invertebrates with Special Remarks on Nematodes. *International Journal of Zoology*. 2009, **2009**, 1-13. ISSN 1687-8477. Dostupné z: doi:10.1155/2009/218197
- [61] ZÄNKER, Kurt S. Immunology of Invertebrates: Humoral. *Wiley Online Library*. 2010. Dostupné z: doi:10.1002/9780470015902.a0000522.pub2
- [62] EISENBRAND, G, B POOL-ZOBEL, V BAKER et al. Methods of in vitro toxicology. *Food and Chemical Toxicology*. 2002, **40**(2-3), 193-236. ISSN 02786915. Dostupné z: doi:10.1016/S0278-6915(01)00118-1

- [63] LI, Xinyan, Bilin ZHAO, Lijuan LUO, Yiluan ZHOU, Dongmei LAI a Tiangang LUAN. In vitro immunotoxicity detection for environmental pollutants: Current techniques and future perspectives. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2023, **158**. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2022.116901
- [64] ZHANG, Guohong, Vanessa GURTU, Steven KAIN a Guochen YAN. Early Detection of Apoptosis Using a Fluorescent Conjugate of Annexin V. *BioTechniques*. 1997, **23**(3), 525-531. ISSN 0736-6205. Dostupné z: doi:10.2144/97233pf01
- [65] ZOROV, Dmitry, Magdalena JUHASZOVA a Steven SOLLOTT. Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release. *Physiological Reviews*. 2014, **94**(3), 909-950. ISSN 0031-9333. Dostupné z: doi:10.1152/physrev.00026.2013
- [66] BARTOSZ, Grzegorz. Use of spectroscopic probes for detection of reactive oxygen species. *Clinica Chimica Acta*. 2006, **368**(1-2), 53-76. ISSN 00098981. Dostupné z: doi:10.1016/j.cca.2005.12.039
- [67] SOH, Nobuaki. Recent advances in fluorescent probes for the detection of reactive oxygen species. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2006, **386**(3), 532-543. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-006-0366-9
- [68] XING, Fuyong a Lin YANG. Robust Nucleus/Cell Detection and Segmentation in Digital Pathology and Microscopy Images: A Comprehensive Review. *IEEE Reviews in Biomedical Engineering*. 2016, **9**(9), 234-263. ISSN 1937-3333. Dostupné z: doi:10.1109/RBME.2016.2515127
- [69] WAITHE, Dominic, Jill BROWN, Katharina REGLINSKI, Isabel DIEZ-SEVILLA, David ROBERTS a Christian EGGELING. Object detection networks and augmented reality for cellular detection in fluorescence microscopy. *Journal of Cell Biology*. 2020, **219**(10). ISSN 0021-9525. Dostupné z: doi:10.1083/jcb.201903166
- [70] ANTAL, P., S. SIPKA, P. SURÁNYI, I. CSIPO, T. SERES, L. MARÓDI a G. SZEGEDI. Flow cytometric assay of phagocytic activity of human neutrophils and monocytes in whole blood by neutral red uptake. *Annals of Hematology*. 1995, **70**(5), 259-265. ISSN 0939-5555. Dostupné z: doi:10.1007/BF01784045

- [71] MIKEROV, Anatoly, Todd UMSTEAD, Xiaozhuang GAN, Weixiong HUANG, Xiaoxuan GUO, Guirong WANG, David PHELPS a Joanna FLOROS. Impact of ozone exposure on the phagocytic activity of human surfactant protein A (SP-A) and SP-A variants. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2008, **294**(1), 121-130. ISSN 1040-0605. Dostupné z: doi:10.1152/ajplung.00288.2007
- [72] SMIT, J.W., C.J.L.M. MEIJER, F. DECARY a Thea FELTKAMP-VROOM. Paraformaldehyde fixation in immunofluorescence and immunoelectron microscopy. *Journal of Immunological Methods*. 1974, **6**(1-2), 93-98. ISSN 00221759. Dostupné z: doi:10.1016/0022-1759(74)90093-3
- [73] CLARK, Michael, Richard LISTER a Moshe BAR-JOSEPH. ELISA techniques. *Plant Molecular Biology*. Elsevier, 1986, (118), 742-766. Methods in Enzymology. ISBN 9780121820183. Dostupné z: doi:10.1016/0076-6879(86)18114-6
- [74] DOBROVOLSKAIA, Marina, Dori GERMOLEC a James WEAVER. Evaluation of nanoparticle immunotoxicity. *Nature Nanotechnology*. 2009, **4**(7), 411-414. ISSN 1748-3387. Dostupné z: doi:10.1038/nnano.2009.175
- [75] GRASMAN, Keith A. In Vivo Functional Tests for Assessing Immunotoxicity in Birds. *Immunotoxicity Testing*. Totowa, NJ: Humana Press, 2010, **598**, 387-398. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-60761-400-5. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-60761-401-2_25
- [76] DOBROVOLSKAIA, Marina a Scott MCNEIL. Understanding the correlation between in vitro and in vivo immunotoxicity tests for nanomedicines. *Journal of Controlled Release*. 2013, **172**(2), 456-466. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2013.05.025
- [77] EYAMBE, G., ET AL. Extrusion protocol for use in chronic immunotoxicity studies with earthworms (*Lumbricus terrestris*) coelomic leukocytes. *Lab Anim*. 1991, (25), 61-67.
- [78] BROUSSEAU, P., N. FUGÈRE, J. BERNIER, D. CODERRE, D. NADEAU, G. POIRIER a M. FOURNIER. Evaluation of earthworm exposure to contaminated soil by cytometric assay of coelomocytes phagocytosis in *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta).

- Soil Biology and Biochemistry*. 1997, **29**(3-4), 681-684. ISSN 00380717. Dostupné z: doi:10.1016/S0038-0717(96)00029-6
- [79] VERNILE, Pasqua, Francesca FORNELLI, Giuseppe BARI, Matteo SPAGNUOLO, Fiorenza MINERVINI, Enrico DE LILLO a Pacifico RUGGIERO. Bioavailability and toxicity of pentachlorophenol in contaminated soil evaluated on coelomocytes of *Eisenia andrei* (Annelida: Lumbricidae). *Toxicology in Vitro*. 2007, **21**(2), 302-307. ISSN 08872333. Dostupné z: doi:10.1016/j.tiv.2006.09.026
- [80] *A simple protocol isolate and culture coelomic cells of Earthworms*. 2015, . ISSN 2319-7706.
- [81] HENDAWI, M, S SAUVÉ, M ASHOUR, P BROUSSEAU a Michel FOURNIER. A new ultrasound protocol for extrusion of coelomocyte cells from the earthworm *Eisenia fetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2004, **59**(1), 17-22. ISSN 01476513. Dostupné z: doi:10.1016/j.ecoenv.2003.07.015
- [82] SAUVÉ, S., M. HENDAWI, P. BROUSSEAU a M. FOURNIER. Phagocytic Response of Terrestrial and Aquatic Invertebrates Following in Vitro Exposure to Trace Elements. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2002, **52**(1), 21-29. ISSN 01476513. Dostupné z: doi:10.1006/eesa.2001.2125
- [83] BRANSKÁ, BARBORA, ET AL. Stanovení viability mikroorganismů pomocí fluorescenční analýzy. *Chem. Listy*. 2011, (105), 586-593.
- [84] ZHANG, Yong, Shuai GUO a Chaoxian WEI. Fluorescence Spectroscopy: Part I Principles. *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences*. Elsevier, 2022, (1). ISBN 9780124095489. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-822974-3.00081-1
- [85] HARVEY, DAVID. Modern analytical chemistry. *McGraw-Hill*. New York, 2000, **1**, 423-433.
- [86] Instrumentation for Fluorescence Spectroscopy. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Boston, MA: Springer US, 2006, (3), 27-61. ISBN 978-0-387-31278-1. Dostupné z: doi:10.1007/978-0-387-46312-4_2

- [87] NAHATA, Alok. Spectrofluorimetry as an Analytical Tool. *Pharmaceutica Analytica Acta*. 2011, **02**(08), 1-2. ISSN 21532435. Dostupné z: doi:10.4172/2153-2435.1000107e
- [88] LAKOWICZ, Joseph R. Introduction to Fluorescence. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Boston, MA: Springer US, 1999, 1-23. ISBN 978-1-4757-3063-0. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4757-3061-6_1
- [89] KAPUSCINSKI, Jan. DAPI: a DNA-Specific Fluorescent Probe. *Biotechnic & Histochemistry*. 2009, **70**(5), 220-233. ISSN 1052-0295. Dostupné z: doi:10.3109/10520299509108199
- [90] RODIONOVA, Natalja, Emilia ROTA, Aleksandra TSARKOVA a Valentin PETUSHKOV. Progress in the Study of Bioluminescent Earthworms. *Photochemistry and Photobiology*. 2017, **93**(2), 416-428. ISSN 00318655. Dostupné z: doi:10.1111/php.12709
- [91] DU, Lijie, Aimin WU, Guanhui LIU, Hua LI, Bing YU, Hua ZHEN a Xianxiang WANG. Green autofluorescence eleocytes from earthworm as a tool for detecting environmental iron pollution. *Ecological Indicators*. 2020, **108**. ISSN 1470160X. Dostupné z: doi:10.1016/j.ecolind.2019.105695
- [92] Počítání v Bürkerově komůrce. In: *Is.muni.cz* [online]. muni, 2016 [cit. 2023-01-31]. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/sci/jaro2016/Bi8250c/um/52663438/54012848/Pocitani_v_Burkero_ve_komurce.pdf
- [93] IRIZAR, Amaia, Carlos RIVAS, Nerea GARCÍA-VELASCO, Felipe Goñi DE CERIO, Javier ETXEBARRIA, Ionan MARIGÓMEZ a Manu SOTO. Establishment of toxicity thresholds in subpopulations of coelomocytes (amoebocytes vs. eleocytes) of *Eisenia fetida* exposed in vitro to a variety of metals: implications for biomarker measurements. *Ecotoxicology*. 2015, **24**(5), 1004-1013. ISSN 0963-9292. Dostupné z: doi:10.1007/s10646-015-1441-9
- [94] PŁYTYCZ B, HOMA J, KOZIOŁ B, RÓZANOWSKA M, MORGAN AJ. Riboflavin content in autofluorescent earthworm coelomocytes is species-specific. *Folia Histochem Cytobiol*. 2006, **44**(4), 275-280.

- [95] National Center for Biotechnology Information. In: *PubChem Compound Summary for CID 493570: Riboflavin* [online]. 2023 [cit. 2023-04-07]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Riboflavin>.
- [96] BILEJ, M, J SCHEERLINCK, T VANDENDRIESSCHE, P DEBAETSEIER a V VETVICKA. The flow cytometric analysis of in vitro phagocytic activity of earthworm coelomocytes (*Eisenia foetida*; Annelida). *Cell Biology International Reports*. 1990, **14**(9), 831-837. ISSN 03091651. Dostupné z: doi:10.1016/0309-1651(90)90010-V
- [97] PLYTYCZ, Barbara, Edyta KIELBASA, Anna GREBOSZ, Michal DUCHNOWSKI a A. MORGAN. Riboflavin mobilization from eleocyte stores in the earthworm *Dendrodrilus rubidus* inhabiting aerially-contaminated Ni smelter soil. *Chemosphere*. 2010, **81**(2), 199-205. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2010.06.056
- [98] LINTHICUM, D.S., E.A. STEIN, D.H. MARKS a E.L. COOPER. Electron-microscopic observations of normal coelomocytes from the earthworm, *Lumbricus terrestris*. *Cell and Tissue Research*. 1977, **185**(3), 315-330. ISSN 0302-766X. Dostupné z: doi:10.1007/BF00220292
- [99] YAN, Zengguang, Beixin WANG, Dongli XIE et al. Uptake and toxicity of spiked nickel to earthworm *Eisenia fetida* in a range of Chinese soils. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2011, **30**(11), 2586-2593. ISSN 07307268. Dostupné z: doi:10.1002/etc.657
- [100] LOCK, Koen a Colin JANSSEN. Ecotoxicity of nickel to *Eisenia fetida*, *Enchytraeus albidus* and *Folsomia candida*. *Chemosphere*. 2002, **46**(2), 197-200. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/S0045-6535(01)00112-6
- [101] HOMA, Joanna, Agnieszka RORAT, Jerzy KRUK, Claude COCQUERELLE, Barbara PLYTYCZ a Franck VANDENBULCKE. Dermal exposure of *Eisenia andrei* earthworms: Effects of heavy metals on metallothionein and phytochelatin synthase gene expressions in coelomocytes. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2015, **34**(6), 1397-1404. ISSN 07307268. Dostupné z: doi:10.1002/etc.2944
- [102] PODOLAK, Agnieszka, Elzbieta PIOTROWSKA, Malgorzata KLIMEK, Beata KLIMEK, Jerzy KRUK a Barbara PLYTYCZ. Effects of Nickel, Zinc, and Lead-

Contaminated Soil on Burrowing Rate and Coelomocytes of the Earthworm, *Allolobophora chlorotica*. *Folia Biologica*. 2011, **59**(3), 91-97. ISSN 0015-5497. Dostupné z: doi:10.3409/fb59_3-4.91-97

[103] GOVEN, AJ; VENABLES, BJ; FITZPATRICK, LC; COOPER, EL. AN INVERTEBRATE MODEL FOR ANALYZING EFFECTS OF ENVIRONMENTAL XENOBIOTICS ON IMMUNITY. *Health & Environmental Research Online (HERO)*. 1987, **5**(4), 1987-1988.

[104] HENDAWI, M, S SAUVÉ, M ASHOUR, P BROUSSEAU a Michel FOURNIER. A new ultrasound protocol for extrusion of coelomocyte cells from the earthworm *Eisenia fetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2004, **59**(1), 17-22. ISSN 01476513. Dostupné z: doi:10.1016/j.ecoenv.2003.07.015