

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

**Hormonálně řízená obrana proti hmyzím
patogenům**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: Karolina Bodláková

Vedoucí práce: prof. RNDr. Dalibor Kodrík, CSc.

Místo a rok vydání: České Budějovice, 2020

BodlÁková K., 2020: HormonÁlně řízenÁ obrana proti hmyzím patogenům. [Hormonally controlled defense against insect pathogens. Bachelor thesis, in Czech] – 42.p., Faculty of Science, University of South Bohemia, ČeskÉ Budějovice, Czech Republic.

Anotation

The aim of this bachelor thesis was to characterize the effect of one insect pathogen (entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*) and one venom (from the honey bee *Apis mellifera*) on digestive enzymes (amylases, proteases, lipases), and on adipokinetic hormone production in the brain of the cockroach *Periplaneta americana*. The experiments were done with the adult male and female cockroaches from a colony kept in the Insectary in the Institute of Entomology BC CAS. The pathogen/venom were applied into the cockroach body by injection 24 hours before the processing. After that the activity of digestive enzymes in the midgut, and AKH level in the brain were monitored. The results showed that the nematode has no effect on enzymes, and on AKH level as well. On the other hand, the bee venom partially increased the activity of digestive enzymes, but the role of AKH in this process is not completely clear.

ProhlÁšení

Prohlašuji, že svoji bakalÁrskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalÁrské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databÁze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 20. května 2020

.....

Poděkování

Děkuji všem, kteří přispěli ke vzniku této práce, především pak panu prof. RNDr. Daliboru Kodříkovi CSc., za celkové seznámení s problematikou, poskytnutí zázemí i materiálu k uskutečňování pokusů, a především za velkou trpělivost a ochotu při vedení mé bakalářské práce. Velké díky patří také celému kolektivu laboratoře Fyziologie hmyzu ENTÚ za poskytovanou praktickou pomoc ve všech ohledech a příjemné chvíle strávené v laboratoři. Speciální poděkování patří Ing. Heleně Štěrbové za odborné a praktické rady při uskutečňování pokusů. Velké díky patří také mé praktické lékařce MUDr. Lence Teplé za profesionální a velmi ochotný přístup, díky kterému jsem mohla tuto práci i přes zdravotní indispozice dokončit. V neposlední řadě děkuji svojí rodině za psychickou podporu při sepisování práce.

Práce byla podpořena grantem školitele (DK) 1703253S z Grantové agentury České republiky.

Obsah

1.	Teoretický úvod.....	1
1.1.	Hmyzí hormony	1
1.1.1.	Hormonální soustava bezobratlých	1
1.1.2.	Hormonální soustava hmyzu	1
1.1.3.	Základní skupiny hmyzích hormonů.....	2
1.1.4.	Adipokinetické hormony	3
1.2.	Šváb americký – <i>Periplaneta americana</i>	4
1.2.1.	Obecné informace.....	4
1.2.2.	Morfologie.....	5
1.3.	Enzymy.....	7
1.3.1.	Význam enzymů v organismu	7
1.3.2.	Amylázy	7
1.3.3.	Proteázy.....	8
1.3.4.	Lipázy.....	8
1.4.	Reakce hmyzu na stres.....	8
1.5.	Entomopatogenní hlístice (EPN).....	9
1.5.1.	Obecné informace.....	9
1.5.2.	Intoxikace, metabolity a virulence.....	9
1.5.3.	Obrana hmyzu proti infekci	10
1.6.	Včelí jed.....	11
1.6.1.	Obecné informace.....	11
1.6.2.	Intoxikace, metabolity a virulence.....	12
2.	Cíle práce	13
3.	Materiál a metodika	14
3.1.	Chov modelových druhů	14
3.1.1.	Šváb americký <i>Periplaneta americana</i>	14
3.1.2.	Háďátka <i>Steinernema carpocapsae</i>	14
3.1.3.	Včela medonosná <i>Apis mellifera</i> L.	14
3.2.	Pitva včelího jedového váčku	15
3.3.	Aplikace EPN, včelího jedu a adipokinetických hormonů	15
3.4.	Stanovení mortality	16
3.5.	Pitva švába amerického <i>P. americana</i>	16
3.5.1.	Střevo	16
3.5.2.	Mozek.....	17

3.6.	Extrakce enzymů ze středního střeva	18
3.7.	Stanovení enzymatické aktivity	18
3.7.1.	Stanovení amylázové aktivity pomocí rozpustného škrobu	18
3.7.2.	Stanovení proteázové aktivity pomocí resorufin – kaseinu	19
3.7.3.	Stanovení lipázové aktivity pomocí kinetické fluorescence	19
3.8.	Stanovení hladiny AKH.....	20
3.9.	Zpracování výsledků	22
4.	Výsledky.....	23
4.1.	Vliv EPN na mortalitu.....	23
4.2.	Vliv infekce EPN na aktivitu trávicích enzymů.....	23
4.3.	Vliv infekce EPN na CNS	25
4.4.	Vliv infekce včelího jedu na mortalitu	26
4.5.	Vliv včelího jedu na aktivitu trávicích enzymů	26
5.	Diskuze.....	30
6.	Závěr.....	33
7.	Seznam použité literatury.....	34

1. Teoretický úvod

1.1. Hmyzí hormony

1.1.1. Hormonální soustava bezobratlých

Naše znalosti o hormonální soustavě bezobratlých nejsou zdaleka tak rozsáhlé jako znalosti o hormonální soustavě obratlovců. Přesto existuje několik skupin bezobratlých, kde se podařilo shromáždit poměrně hodně informací. Díky nim můžeme hormonální soustavy obou skupin srovnat. Je zřejmé, že mezi nimi můžeme nalézt řadu rozdílů, ale nalézáme i shodné znaky. V obou případech se vyskytuje velké množství peptidických hormonů, u bezobratlých hovoříme o neurohormonech, u obratlovců o hormonech pravých. Obě skupiny pak mají také některé hormony shodné (např. katecholaminy, inzulin), takže lze ke studiu savčích hormonů někdy využít zástupce bezobratlých. V neposlední řadě mají hormony bezobratlých i obratlovců stejné základní stavební jednotky (aminokyseliny, peptidy, bílkoviny, steroidy).

Oproti tomu existuje jeden podstatný rozdíl mezi oběma skupinami, konkrétně jde o rozdíl v počtu pravých hormonů a neurohormonů – bezobratlí mají velký počet neurohormonů a málo pravých hormonů, u obratlovců jsou známy pouze dva neurohormony (vasopresin a oxytocin) a většinu tvoří hormony pravé.

Obecně jsou u většiny bezobratlých hormony prozkoumány docela málo, výjimku tvoří korýši a hmyz, kde je známo velké množství informací.

1.1.2. Hormonální soustava hmyzu

Mezi bezobratlými je nejlépe prozkoumána hormonální soustava u hmyzu. Tvoří ji dvě základní soustavy a řada buněk, které vykazují endokrinní funkci.

První soustavu tvoří neurosekretické buňky mozku, a (zpravidla) párové endokrinní žlázy corpora cardiaca (CC) a corpora allata (CA). Často je tato soustava srovnávána s hypotalamo-hypofyzární soustavou obratlovců. Jedná se o hlavní řídicí systém hmyzu, který sekretuje vlastní neurohormony (skupina adipokinetických hormonů), řídicí neurohormony (např. prothoracikotropní hormon – PTTH) i hormony pravé (juvenilní hormony). V mozku se zpravidla nachází dvě skupiny neurosekretorických buněk, jedna z nich je lokalizována v pars intercerebralis (mediální buňky), druhá je variabilní, ale výskyt je spíše v pars lateralis. Neurohormony produkované touto soustavou řídí přímo efektorový orgán nebo regulují činnost dalších endokrinních žláz. V blízkosti mozku se nachází corpora cardiaca, která nasedají na aortu a produkují vlastní neuropeptidy nebo fungují jako neurohemální orgán,

Jelikož sem ústí zakončení axonů neurosekretorických buněk mozku. Poslední částí této soustavy jsou párová corpora allata (někdy splývají v jeden orgán), která jsou situována v oblasti hltanu a produkují juvenilní hormony. Jejich velikost je závislá na věku, velikosti aorty, pohlaví a aktivitě orgánu.

Druhou endokrinní soustavu tvoří prothorakální žlázy, které mají nepravidelný tvar a jsou umístěny v prothoraxu (první hrudní článek). Jejich funkcí je produkce steroidních hormonů (ekdysteroidů). Ve většině případů jsou nervově spojeny s ganglii, ale i s mozkem (šváb). Přítomnost prothorakálních žláz je přímo spojena s juvenilními hormony (redukce u imag).

Do hormonální soustavy hmyzu řadíme i neurosekretorické buňky dalších ganglií, které sekretují další neurohormony. Spadají sem i endokrinní buňky střeva, které vylučují peptidy často neznámé funkce (procesy trávení). Dále pak epittracheální buňky, které jsou lokalizovány na tracheách v oblasti spirakula a produkují hormony ovlivňující ekdyzi. Poslední skupinou buněk jsou gonády, které produkují hormony regulující pohlavní funkce.

1.1.3. Základní skupiny hmyzích hormonů

1.1.3.1. Ekdysteroidy

První skupinu hmyzích hormonů tvoří ekdysteroidy, které jsou někdy nazývány svlékací hormony. Základním hormonem skupiny je ekdyson odvozený od cholesterolu. Jde o prohormon pro 20-hydroxyekdyson vznikající z ekdysonu až v cílové tkáni. Syntetizuje se primárně v prothorakálních žlázách, ale i v jiných tkáních a orgánech jako je epidermis nebo gonády. Jedná se o steroidní hormon řídící děje na úrovni DNA – exprese genů a syntézu nových enzymů.

Ekdysteroidy zajišťují ekdyzi, metamorfózu a u dospělců řídí děje při rozmnožování.

1.1.3.2. Juvenilní hormony

Juvenilní hormony jsou terpenoidní povahy a jsou odvozené od kyseliny farnesilové. Je jich několik typů – typ je dán vazbou dvou molekulových radikálů, které se připojují na tři pozice v základní molekulové kostře. Produkce je vázána na žlázu corpora allata, z které jsou uvolňovány pod kontrolou nadřazených neurohormonů allostatinů a allotropinů nebo pomocí nervových vzruchů. Podobně jako ekdysteroidy i juvenilní hormony ovlivňují v cílové tkáni genovou expresi v DNA. Jejich přenos hemolymfou je realizován pomocí bílkovinného přenašeče, který zamezuje enzymatické degradaci.

Juvenilní hormony se nejvíce uplatňují při metamorfóze. U juvenilních jedinců zajišťují, aby metamorfóza nenastala dříve, než je jedinec plně vyvinutý a zprostředkovávají dostatečnou výživu larev. Vyváženost juvenilních hormonů je důležitá pro správnou regulaci vývoje, odchylky způsobují vývojové chyby. U dospělců juvenilní hormony řídí rozmnožování, hlavně vitellogenezi u samic.

1.1.3.3. Peptidické neurohormony

Peptidické neurohormony tvoří nejobsáhlejší skupinu hmyzích hormonů, jež jsou nezbytně nutné pro správnou funkčnost a provázání všech procesů v těle hmyzu v průběhu života. Syntetizovány jsou pomocí neurosekretorických buněk nervové soustavy – dělíme je na neurohormony řídicí a výkonné. Podle svých funkcí se dělí na řadu skupin. Známou skupinou těchto hormonů jsou např. prothoracicotropní hormony, které jsou produkovány v neurosekretorických buňkách mozku a řídí činnost prothorakální žlázy, takže regulují syntézu ekdysteroidů.

Velmi dobře probádanou skupinou neurohormonů jsou adipokinetické hormony, které detailněji popisuje následující kapitola.

1.1.4. Adipokinetické hormony

Adipokinetické hormony (AKH) jsou hormony ze skupiny peptidických neurohormonů, spadající do podskupiny hormonů regulujících metabolismus a homeostázu. Jedná se o nejpočetnější a nejlépe prozkoumanou skupinu peptidických neurohormonů. Dnes je u hmyzu známo již asi 60 zástupců. AKH byly popsány napříč všemi významnými řády hmyzu včetně švába.

U švába amerického *Periplaneta americana* (viz níže) se nachází dva zástupci, konkrétně jde o peptidy skládající se z osmi aminokyselin (oktapeptidy) označované jako Peram-CAH-I (*Periplaneta americana* cardioaccelerating hormone I) o složení: pGlu-Val-Asn-Phe-Ser-Pro-Asn-Trp-NH₂ a Peram-CAH-II o složení: pGlu-Leu-Thr-Phe-Thr-Pro-Asn-Trp-NH₂ (Scarborough a kol., 1984).

Syntéza AKH probíhá v párové žláze corpora cardiaca, odkud jsou sekretovány do hemolymfy a následně transportovány k cílovým tkáním. Tyto hormony mají v těle hmyzu nezastupitelnou úlohu, často jsou označovány za stresové hormony (jsou vylučovány ve stresových situacích). Mezi primární funkci patří mobilizace lipidů nebo glycidů z tukového tělesa a podle této úlohy dostaly svůj název. Mobilizace lipidů je zahájena uvolněním AKH

z corpora cardiaca, následně putují do buněk tukového tělesa (analogie jater savců). V tukovém tělese je AKH signál převeden na nitrobuňčný signál přes specifický receptor pomocí druhého posla (cyklický adenosinmonofosfát cAMP). Druhý posel v přítomnosti vápenatého kationtu Ca^{2+} aktivuje proteinkinázovou kaskádu, která vede k aktivaci lipázy a následnému štěpení triacylglycerolu na diacylglycerol (transportní forma tuků u hmyzu). Diacylglycerol je pomocí specifického přenašeče transportován přes hemolymfu do místa spotřeby (pracující sval), kde ve svalových buňkách dochází k rozkladu na glycerol a mastné kyseliny. Mastné kyseliny jsou následně enzymaticky odbourávány a organismu dodávají uvolněnou energii.

Poněkud jiná signální kaskáda je využívána při AKH stimulovaném odbourávání zásob glykogenu pomocí glykogen-fosforylázy. Po aktivaci G-proteinu nastává stimulace fosfolipázy C, jejímž hlavním úkolem je rozštěpit inositolový fosfolipid na IP_3 a DAG. Následuje spuštění proteinkinázové kaskády, která vede k aktivaci glykogen-fosforylázy. Ta dále štěpí glykogen na glukózu, která se mění na trehalózu. Vznikající disacharid trehalóza slouží jako zdroj energie a je hemolymfou transportována až do místa spotřeby (Gäde a kol., 1997).

Kromě funkcí v energetickém metabolismu mají AKH další důležité funkce. Mezi ně se řadí stimulace srdeční činnosti, zvýšení napětí ve svalech, stimulace pohybové aktivity, aktivace imunitního systému, stimulace příjmu potravy a absorpce živin, inhibice syntézy lipidů, bílkovin a RNA, obrana proti oxidačnímu stresu a některé další (Kodřík, 2008; Kodřík a kol., 2015). V mých předcházejících pracích bylo zjištěno také přímé zapojení AKH do řízení enzymatické aktivity střev a ovlivnění trávicích procesů (Bodláková a kol. 2017, 2018). Uvolňování AKH z corpora cardiaca do hemolymfy je zpravidla kontrolováno zpětno-vazebně hladinou metabolitů. Po ukončení působení dojde k deaktivaci AKH v hemolymfě pomocí endopeptidáz (Gäde a kol., 1997).

1.2. Šváb americký – *Periplaneta americana*

1.2.1. Obecné informace

Šváb americký je živočich z kmene členovců (Arthropoda), podkmene vzdušnicovců (Tracheata), patřící do třídy hmyzu (Insecta) a řádu švábi – Blattodea. Jedná se o hmyz s proměnou nedokonalou, který je kosmopolitně rozšířen.

Šváb americký je považován převážně za nočního živočicha, který se vyskytuje více ve městech, ve veřejných budovách, nejčastěji ale ve skladech potravin a zemědělských produktů. Bývá označován za významného škůdce, jelikož znehodnocuje a znečišťuje uložené potraviny. Výskyt je spojen hlavně s tmavými, vlhkými a teplými místy. Jedná se o všežravce, zajímavostí je, že vydrží hladovět až pět týdnů.

Primární formou pohybu švába je běh, ke kterému využívá kráčivé a velmi dobře vyvinuté končetiny, oproti tomu letecké schopnosti jsou špatné. Velmi dobře vnímá malé otřesy a zvuky o nízké frekvenci. Obecně jsou švábi američtí plaší živočichové, kteří svlékají kutikulu 7 - 13x za život, než se dostanou do dospělého stádia. Dožívají se až tři let. Jelikož jsou to velmi odolní a velice přizpůsobiví zástupci hmyzu, využívají se hojně v laboratořích pro vědecké výzkumy.

1.2.2. Morfologie

Pro dospělé švába amerického je charakteristické červenohnědé zbarvení, tělo dosahuje délky 35-50 milimetrů, má typický hnědý štít se žlutými okraji a světlými skvrnami na křídlech. Najdeme zde veškeré typické hmyzí znaky. Tělo je členěno na hlavu (caput), hrud' (thorax) a zadeček (abdomen), má dva páry křídel a tři páry nohou. Švábi jsou označováni za nejpůvodnější skupinu křídlatého hmyzu, která se nepodrobila větším evolučním změnám od karbonu v prvohorách, kdy byla na Zemi poprvé zaznamenána.

Na hlavě můžeme najít velké složené oči, pár dlouhých tykadel a jednoduchá očka (ocelli). Velmi dobře rozvinuté jsou čichové receptory, které jsou lokalizovány na tykadlech, ale také pohlavních orgánech. Čich totiž slouží také k vyhledávání opačného pohlaví – samice produkují feromony a samci afrodiziaka, kterými stimulují samici k páření. Na hlavě se nachází také kousací ústní ústrojí, které je složeno ze svrchního pysku, páru mohutných kusadel, páru čelistí s článkovanými makadly a nepárového spodního pysku.

Hrud' tvoří tři články – předohrud' (prothorax), středohrud' (mesothorax) a zadohrud' (metathorax). Každý hrudní článek na sobě má jeden pár kráčivých končetin. Kráčivá končetina je složena z pěti částí – kyčel, příkyčlí, stehno, holeň a chodidlo z pěti článků, kdy na posledním jsou umístěny dva drápky, a na spodní straně se nalézá přísavný polštářek. Mesothorax a metathorax jsou kryty dvěma páry křídel, první pár jsou kožovité krytky (tegminae), druhý blanitá křídla. Křídla jsou protkaná vzdušnicemi a nervy, okem viditelnými jako žilnatina.

Zadeček je složen z 11 článků, kdy poslední jsou přeměněny a zastávají pohlavní funkci. Podle těchto článků lze determinovat, o jaké pohlaví švába se jedná – samec má na zadečku dva páry

končetinových přívěšků, v porovnání se samicí, která má jen jeden. Samice v průběhu života vyprodukuje asi 40 oothék (14-18 vajíček v chitinové schránce), které odkládá jeden den po vynoření z pohlavního ústrojí. Délka vývoje švába amerického je velmi variabilní – pohybuje se přibližně v rozmezí 4-15 měsíců.

1.2.3. Anatomie a fyziologie

Anatomie vnitřních orgánů a orgánových soustav u švába amerického kopíruje stavební plán ostatních skupin hmyzu. Povrch je krytý integumentem s chitinózní kutikulou (komplex nese označení exoskelet), kde dochází k úponu příčně pruhovaných svalů zajišťujících pohyb.

Cévní soustava je otevřená s trubicovitým srdcem, dýchání zprostředkovávají vzdušnice, odpadní látky z těla vylučují Malpighické trubice.

Na celkovém řízení organismu se podílí nervová a endokrinní soustava. Sídlem nervové soustavy je mozek, který je umístěný v hlavové schránce, a systém ganglií propojených břišní nervovou páskou. Smyslové podněty jsou zprostředkovávány pomocí mechanoreceptorů, termoreceptorů, fotoreceptorů a chemoreceptorů. Endokrinní soustava zajišťuje syntézu hormonů, které dále řídí nitrobuněčné děje a regulují tak většinu dějů v organismu.

Trávicí soustava má více funkcí – zachycení potravy, mechanické a chemické zpracování, předání živin cévní soustavě, odstranění nestravitelných zbytků řitním otvorem z těla. Střevo švába amerického je tvořeno třemi částmi. Přední střevo (stomodeum) zajišťuje mechanické zpracování potravy, má proto velmi dobře vyvinutou svalovinu. Stomodeum má několik částí – dutina ústní, pharynx (hltan), oesophagus (jícen), ingluvies (vole) a proventriculus (žvýkací žaludek). Druhou částí je střední střevo (mesenteron), kde probíhá chemické trávení a zpracování živin. Je tvořeno ventriculem a slepými výběžky (caeca), které zvětšují vnitřní plochu střeva. Na hranici předního a středního střeva vzniká peritrofická membrána, jejíž funkcí je omezit přímý kontakt střeva se sliznicí a plní ochrannou funkci epitelu před mechanickým i enzymatickým poškozením. Peritrofická membrána je jemná chitinová blanka s bílkovinami a glykoproteiny. Poslední část tvoří zadní střevo (proctodeum), které je členěno na ileum, colon a rectum. Jeho funkcí je resorpce solí a vody. Řitním otvorem následně ústní ven z těla. Svalovina střeva je složena pouze z příčně pruhovaných svalů (na rozdíl od obratlovců), na povrchu je umístěna tracheální (vzdušnicová) soustava. . Trávení živin začíná slinami, které vylučují slinné žlázy. Sliny potravu zvlhčují a upravují pH, čímž vytváří vhodné prostředí pro enzymy. Podstatná část chemického trávení však probíhá ve středním střevě, kde

epiteliální buňky vylučují enzymy (Lehane a Billingsley, 1996). Činností enzymů dochází k rozkladu polymerů na monomery. pH střeva švába je většinou neutrální. Šváb je známý také tím, že se v různých částech jeho středního střeva tráví různé živiny, je zde tedy určitá prostorová specializace trávení (Tamaki a kol., 2014). Tento jev je známý u obratlovců, ale u hmyzu není příliš běžný.

1.3. Enzymy

1.3.1. Význam enzymů v organismu

Enzymy účinkují v těle jako biokatalyzátory. Jedná se o chemické látky, jejichž úkolem je převést chemické reakce na energeticky nižší dráhu tak, aby neovlivnily rovnovážný stav. Tyto látky se v průběhu reakce nespotřebovávají, nemění složení systému, ale zkracují čas potřebný k dosažení chemické rovnováhy. Působení probíhá ve velmi malém množství se specifickým účinkem.

Rozlišují se dva typy katalyzátorů:

1. Pozitivní katalyzátory – urychlují průběh chemických reakcí bez ovlivnění složení a rovnováhy.
2. Negativní katalyzátory – zpomalují průběh reakce a výrazně zvyšují aktivační energii, někdy bývají spíš označovány za inhibitory. Jejich použití je vhodné ke zpomalení nežádoucích reakcí.

Enzymy ve srovnání s chemickými katalyzátory vykazují vyšší účinnost – 1 molekula enzymu přemění až $5 \cdot 10^4$ molekul substrátu, u chemických katalyzátorů je tato rychlost o několik řádů nižší. Kromě této výhody, enzymy též vykazují značnou substrátovou/účinkovou specifitu, pracují za velmi mírných podmínek (teplota 20-40 °C, tlak 0,1 MPa, pH většinou okolo 7), jejich účinek lze snadno regulovat. Za velmi podstatnou výhodu se považuje netoxičnost enzymů v porovnání s katalyzátory chemickými, které jsou vysoce toxické.

1.3.2. Amylázy

Amylázy se řadí mezi glykosidázy a štěpí O-glykosidickou vazbu mezi monosacharidovými jednotkami v oligosacharidu nebo polysacharidu. V přítomnosti vody se na obou koncích štěpené vazby tvoří -OH skupiny. Amylázy se člení do 3 skupin označovaných jako α , β a γ . Alfa-amylázy štěpí α -1,4-glykosidické vazby řetězců dlouhých polysacharidů, ze kterých odštěpují tří- a více glukózových jednotek; jsou hlavními glykosidázami živočichů. Beta-amylázy hydrolyzují také α -1,4-glykosidické vazby, ale s tím rozdílem, že z

polysacharidového řetězce odštěpují vždy dvě poslední glukózové jednotky jako maltózu. Beta-amylázy jsou typické pro rostliny, houby a bakterie. Gama-amylázy štěpí α -1,4- nebo α -1,6-glykosidické vazby, a z polysacharidového řetězce odštěpují molekuly glukózy (Barman, 1969; Karlson, 1981; Vodrážka, 1999).

1.3.3. Proteázy

Proteázy patří do skupiny hydroláz, přesněji mezi proteolytické enzymy štěpící proteiny (bílkoviny). Podle místa štěpení je můžeme rozčlenit do dvou základních skupin. První z nich jsou exoproteázy, které odštěpují aminokyseliny od terminálních konců proteinů. Naopak endoproteázy štěpí proteiny uvnitř peptidického řetězce a narušují jeho terciární strukturu. Z hlediska řízení chemických reakcí jsou důležitější endoproteázy.

1.3.4. Lipázy

Lipázy jsou enzymy, které řadíme také mezi hydrolázy. Konkrétně štěpí tuky na glycerol a mastné kyseliny – rozklad triacylglycerolu na diacyl- a monoacylglycerol. Je zajímavé, že u hmyzu hrají důležitou roli právě diacylglyceroly, protože představují hlavní transportní formu tuků v hemolymfě – u obratlovců tuto úlohu hrají hlavně mastné kyseliny. Lipázy mimo jiné řídí množství syntetizovaného tuku, zajišťuje redukci tukové zásoby a v optimálním množství jsou lipázy schopny pomoci při jeho spalování.

1.4. Reakce hmyzu na stres

Reakce hmyzu i jakéhokoliv jiného organismu na stres je v podstatě fyziologická reakce na neoptimální a nekomfortní podmínky. Reakci lze zkoumat na molekulární, buněčné, fyziologické i behaviorální úrovni.

Hmyz jako skupina živočichů je ve svém evolučním vývoji vystaven řadě stresorů, a to především v závislosti na své pozici v potravních vztazích a predačním tlaku. Právě díky tomu se u hmyzu vyvinula řada odpovědí na stresové podněty, s čímž se zvýšila nejen šance na přežití, ale také na diverzifikaci a modulaci fyziologických pochodů ve snaze maximalizovat účinnost (Adamo, 2017).

Hmyz má proto široké spektrum odpovědí v závislosti na typu stresoru. Mezi hlavní stresory patří stres metabolický (hladovění) a vliv patogenů (infekce, parazitace). Metabolický stres představuje jeden z nejčastějších stresorů, se kterým se organismus potýká po celý život. Odpověď na stres je zprostředkována nervově (rychlé, bezprostřední reakce) a hormonálně (dlouhodobější reakce), a to pomocí biogenních aminů (oktopamin, dopamin, serotonin) i vlastních neurohormonů (Downer, 1979).

Působení patogenů a jejich vliv na stresovou reakci organismu je nyní velmi studovanou problematikou. Daná obranná reakce je optimalizována pomocí hormonální reakce organismu na danou infekci/parazitaci (Adamo, 2017). Během cizího zásahu probíhajícího formou infekce, dochází u většiny druhů ke spuštění obranných reakcí na buněčné a humorální úrovni (Chapman, 1998), z nichž některé jsou řízeny právě hormonální kaskádou. Je známo zapojení AKH do řízení obranných reakcí proti entomopatogenním bakteriím, houbám, hlísticím, parazitoidům či jejich toxinům (Goldsworthy a kol., 2002, 2003, 2005; Kodrík, 2008; Ibrahim a kol., 2017, 2018; Shaik a kol., 2017).

1.5. Entomopatogenní hlístice (EPN)

1.5.1. Obecné informace

Hlístice jsou mnohobuněční živočichové patřící do kmene Nematoda. Jejich výskyt je kosmopolitní s výjimkou Antarktidy, kde doposud nebyli popsáni. Za nejznámějšího zástupce je považován *Caenorhabditis elegans*, který je modelovým organismem pro řadu výzkumů v oblasti vývojové a molekulární biologie.

Mezi stěžejní entomopatogenní čeledi patří Heterorhabditidae a Steinernematidae, jež jsou považováni za obligátní parazity – živí se primárně odumřelými a rozloženými tkáněmi. Zajímavostí těchto dvou čeledí je mutualistický vztah s bakteriemi čeledi Enterobacteriaceae, které pomáhají při usmrcení hostitele a zároveň slouží jako sekundární zdroj potravy. Právě tento mutualistický vztah je zajímavý pro praktické použití v hubení populací hmyzích škůdců, kde se využívá specifita patogenů a relativně nízké náklady. U řady druhů hmyzu ale není stále známo, do jaké míry je smrt hostitele způsobena hlísticí a jakým podílem k tomu přispívá bakterie (Dobeš, 2012).

V dnešní době se ke studiu imunitních odpovědí na stresové reakce používá především komplex *Steinernema-Xenorhabdus* (Adams a kol., 2006; Herbert a Goodrich-Blair, 2007), který byl použitý i v této bakalářské práci. Entomopatogenní nematoda z čeledi Steinernematidae mají symbiotické bakterie lokalizované ve specializovaných váčcích v přední části střeva (Martens et Goodrich-Blair, 2005; Snyder a kol., 2007).

1.5.2. Intoxikace, metabolity a virulence

Životní cyklus *Steinernema carpocapsae* začíná juvenilním infekčním stádiem, které se jako jediné vyskytuje mimo hostitele a je schopné volného pohybu v půdě, kde čeká na přiblížení hostitele nebo ho aktivně vyhledává (Grewal a kol., 1994). K samotnému vniknutí juvenilního stádia do hostitele dochází nejčastěji řitním otvorem, ústy nebo přes tracheje hostitele. Zároveň

dochází k narušení struktury kutikuly a průniku nematod i přes tělní stěnu (Bedding a Molyneux, 1982). Poté, co se povede EPN vniknout do hostitele, vyloučí do jeho těla symbiotické bakterie, u kterých dojde k masivnímu navýšení počtu. Následně dochází k přechodu EPN do dalších instarů až k dosažení pohlavní dospělosti, kdy samičky nakladou vajíčka. Jedinci setrvávají v hostiteli až do vyčerpání výživných látek. Toto vyčerpání je signalizováno například tvorbou prenolu, který svým charakteristickým zápachem informuje jedince EPN i mimo hostitele o vyčerpání živin a nutnosti najít dalšího hostitele.

Bakterie *Xenorhabdus* jsou obecně považovány za velmi patogenní pro hmyzí zástupce – k zabítí larvy zavíječe voskového *Galleria mellonella* je dostačujících pouze 10 až 20 bakteriálních buněk (Forst a Neilson, 1996; Daborn a kol., 2001). Toxické jsou i samotné hlístice, které do těla vylučují proteázy. U druhu *S. carpocapsae* byla zjištěna produkce serinových proteáz a metalloproteáz několik hodin po vstupu do hemoceolu. U tohoto druhu byla zároveň pozorována schopnost usmrtit svého hostitele bez symbiotických bakterií a metamorfovat do dalšího vývojového stádia.

V současné době je již známá řada toxinů, které produkují hlístice a jejich bakterie – patří sem například i Txp40, který napadá buňky tukového tělesa a střev hostitele (Brown a kol., 2006).

Hmyz se napadení hlísticemi brání aktivací svého imunitního systému (podrobně viz níže). Proto je jeho inhibice nebo oslabení pro přežití patogenů velmi důležité, ale zdá se, že hraje i významnou roli v mutualistickém vztahu s bakteriemi. EPN jsou schopny mírnit tvorbu antimikrobiálních obranných peptidů hmyzího hostitele nebo navázat hemocyty na svůj povrch a tím tak inhibovat imunitní odpověď jako celek (Götz a kol., 1981).

1.5.3. Obrana hmyzu proti infekci

Při průniku EPN do těla hmyzího hostitele musí jedinec překonat řadu obranných mechanismů. Jednou z přirozených bariér je překonání střevní stěny hostitele. Střevo se tomuto procesu brání, neboť jeho vnitřní stěnu tvoří proteoglykany (Eismann a Binnington, 1994), které mají střevo chránit nejen před mechanickým poškozením, ale také před vstupem patogenů do buněk střevní stěny. Po překonání bariéry střevní stěny se nachází další bariéra – tuhá bazální membrána obsahující kolagen a laminin (Olson a kol., 1990). Druh *S. carpocapsae* využívá k překonání této překážky již zmíněnou serinovou proteázu Sc-SP-1, která hydrolyzuje komponenty bazální membrány střeva (Toubarro a kol., 2010). Entomopatogenní bakterie uvolněné z EPN osidlují mezibuněčný prostor mezi buňkami střeva (Silva a kol., 2002; Sicard a kol., 2004). Zde pak čelí působení obranných látek produkovaných

hemocyty. Jsou to třeba proteiny obsahující thioester (TEP; Whitten a kol., 2006), které mají opsinové funkce v imunitních odpovědích, stimulují fagocytózu a melanizaci (Lagueux a kol., 2000).

Přestože jsou procesy způsobené EPN ve hmyzím těle dobře prozkoumané, vztah s neurohormonálním systémem není dosud znám.

1.6. Včelí jed

1.6.1. Obecné informace

Včela medonosná *Apis mellifera* je živočich patřící do třídy hmyzu (Insecta), do řádu blanokřídlých (Hymenoptera). Jedná se o jednoho z nejznámějších zástupců tohoto řádu, který je hojně hospodářsky využíván.

Včelí kasty jsou tvořeny ve většině případů jednou matkou, mnoha dělnicemi a několika trubci s jasně definovanými úkoly ve společenstvu.

Jednotlivé části včelího těla (hlava, hrud', zadeček) jsou společně propojeny pomocí zúžení pro lepší pohyblivost. V hrudi se primárně nachází létací svalovina a v zadečku najdeme zažívací orgány, medový váček, jedovou žlázu, vzdušné vaky a žihadlo. Žihadlo je zakončeno sérií zpětných háčků, jež se po bodnutí zaseknou v ráně, a tak nelze žihadlo z rány vytáhnout. Při snaze včely tak učinit dojde k vytržení celého žihadlového aparátu spolu s posledním článkem zadečku, který obsahuje i ganglium. Včela při tom zpravidla zahyne.

Jedový váček obsahuje přibližně 0.1–0.3 miligramů vlastního jedu, který byl vytvořen v párové jedové žláze. Jed při bodnutí proudí jedovým kanálkem, který probíhá celým žihadlem a ústí ven v jeho terminální části zvané bodlo. V případě odtržení žihadlového aparátu po bodnutí jed do těla proudí dalších asi 15 minut – je pumpován příslušnými svaly, které jsou ovládány odtrženým gangliem (Snodgrass, 2018).

Nevýhodou celého procesu je následné uhynutí včely. Existuje několik teorií, které se snaží tento fenomén vysvětlit. První z nich vychází z faktu, že odtržení aparátu nastává pouze v případě bodnutí ptáků či savců. V době, kdy tato strategie vznikla ptáci a savci na Zemi ještě nežili, takže byla primárně určena pro obranu proti hmyzím predátorům – z chitinové kutikuly je žihadlo vytažitelné. Další teorie podporuje myšlenku zajištění vysoké účinnosti přenosu jedu do rány – princip spočívá v obětování jedince ve prospěch včelstva (Bogdanov, 2016; Wehbe a kol., 2019).

1.6.2. Intoxikace, metabolity a virulence

Hmyzí jed je ve své podstatě složený z řady biologicky aktivních látek (aminokyseliny, aminy, peptidy, bílkoviny) rozpuštěných ve vodném roztoku (Chen and Lariviere, 2010). Na cílový organismus působí zpravidla v kaskádách – jednotlivé reakce na sebe navazují, případně se vzájemně stimulují.

U včel činí suchý podíl toxinů přibližně 20-30 % jedu, kdy přibližně polovinu tvoří melittin následovaný enzymem fosfolipázou. Dalšími látkami obsaženými v jedu jsou apanin, minimin, MCD peptid nebo enzym hyaluronidáza. Ostatní biologicky aktivní látky jako je dopamin, histamin, ... jsou zastoupeny v minimální míře – do 1 % (Chen and Lariviere, 2010; Lubawy a kol., 2019).

Nejvíce zastoupený je již výše zmíněný melittin. Jedná se o nízkomolekulární bílkovinu, která má nejen biologické, ale také farmakologické a toxikologické vlastnosti. Z toxického hlediska disponuje schopností aktivovat fosfolipázy a narušovat tak fosfolipidovou vrstvu membrán tvorbou pórů v nich. Tím dojde k unikání buněčného obsahu ven, což má za následek celkový rozpad buněk. K tomu pomáhá také enzym hyaluronidáza, která štěpí mezibuněčné spoje (Lubawy a kol., 2019).

Z řady nízkomolekulárních látek obsažených v jedu je za nejdůležitější považován histamin. Je nejen součástí včelího jedu, ale také se uvolňuje z tkání oběti. Histamin v těle je hlavním stimulačním složkou zánětu, ale také dalších imunitních reakcí. Obecně se tyto nízkomolekulární látky podílí na rychlejším přenosu jedu napříč tělem (rychlejší cirkulace, vyšší srdeční činnost, zvýšení bolestivosti při bodnutí).

2. Cíle práce

Cílem práce bylo:

1. Charakterizovat změny v těle švába *P. americana* po nákaze patogenními hlísticemi sledováním hladin adipokinetických hormonů a vybraných biochemických markerů (aktivita trávicích enzymů, hladina vitellogeninu).
2. Zmapovat změny v aktivitě trávicích enzymů a hladině adipokinetických hormonů po aplikaci včelího jedu a zjistit vliv těchto hormonů na obranné reakce vůči jedu.

Obecně bylo cílem práce ověřit hypotézu, že testovaný patogen a toxin ovlivní aktivitu střevních enzymů, a že případná aplikace adipokinetického hormonu může tuto aktivitu modulovat.

3. Materiál a metodika

3.1. Chov modelových druhů

3.1.1. Šváb americký *Periplaneta americana*

Švábi *P. americana* (Obr. 1) použít pro pokusy v této práci pocházeli z chovů Entomologického ústavu Biologického centra AVČR v Českých Budějovicích. Zvířata byla chována ve skleněných teráriích, kde probíhal vývoj od vajíček po dospělé. Jako zdroj potravy sloužil chléb, mrkev, ovoce a ovesné vločky. Voda byla poskytována z plastové lahvičky, která byla na konci ucpaná vatou. Chovy byly udržovány při konstantní teplotě 30 °C +/- 1 °C a fotoperiodě 12 hodin světlo a 12 hodin tma.



Obr. 1. Šváb americký *P. americana*

3.1.2. Hád'átko *Steinernema carpocapsae*

Pro pokusy byla použita entomopatogenní hád'átka *S. carpocapsae*, která byla chována v laboratorních podmínkách v posledním larválním instaru zavíječe voskového *G. mellonella* jako v hostiteli (Dr. Mráček – Entomologický ústav AVČR). Jedinci infekčního juvenilního stádia hád'átek, kteří byli používáni k infikování pokusných švábů, byli z larev zavíječe voskového izolováni a udržováni v lednici při teplotě 4 °C ve vodě po dobu maximálně 30 dní.

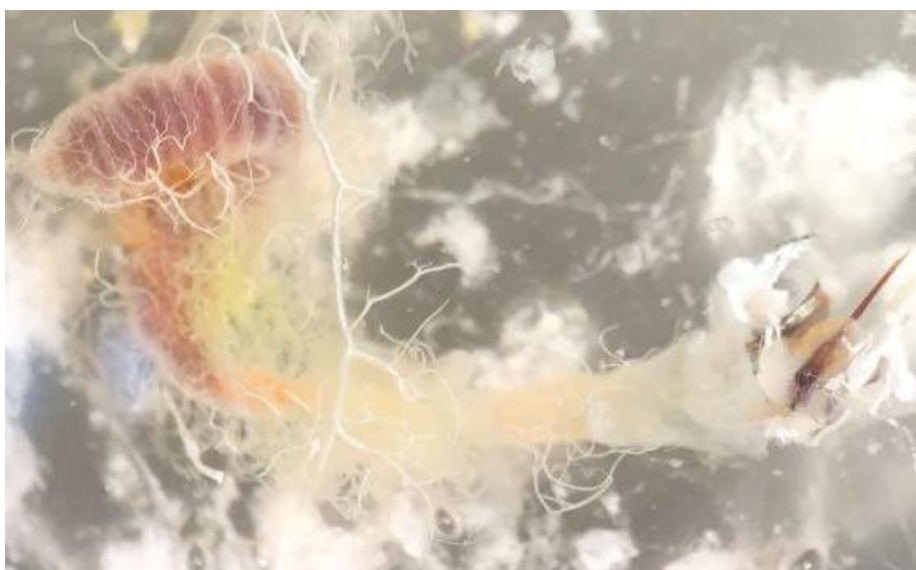
Před samotnou aplikací nematod (EPN) byla vždy ověřena jejich vitalita pod mikroskopem. Zároveň byl určován počet jedinců EPN v 1 μ l (kvůli odpovídající dávce).

3.1.3. Včela medonosná *Apis mellifera* L.

Včely byly získávány z pokusné včelnice Biologického centra AVČR v Českých Budějovicích.

3.2. Pitva včelího jedového váčku

Z pokusných včel bylo potřeba pod pitevním binokulárním mikroskopem vypitvat jedový váček (Obr. 2), který je umístěn v zadečku a je napojený na žihadlo. Pitva probíhala odtržením žihadla a následným oddělením jedového váčku pomocí pinzety. Z vypitvaných váčků byl vytvořen směsný vzorek (50 váčků), který byl rozsonikován v Ringerově fyziologickém roztoku (5 μ l/váček). Po sonikaci následovalo odstředění pomocí centrifugy (5 minut, 10 000 otáček, 4 °C) a v případě potřeby se proces sonikace a centrifugace zopakoval. Vzorek byl následně uchován v mrazničce při teplotě -24 °C pro další použití.



Obr. 2. Vypitvaný včelí jedový váček (vlastní foto).

3.3. Aplikace EPN, včelího jedu a adipokinetických hormonů

Oba stresory – entomopatogenní hád'átka i včelí jed, a také adipokinetické hormony – byly vpraveny do těla švába amerického v místě za třetí končetinou pomocí Hamiltonovy injekční stříkačky. Po aplikaci byli švábi umístěni do 5 l sklenice a po dobu 24 hodin udržováni za standardních podmínek (viz výše).

V případě hlístice *S. carpocapsae* byla injikována dávka 30-40 jedinců (optimální dávka) v objemu 5 μ l.

Včelí jed vpravovaný do těla švába *P. americana* byl kvantifikován tak, aby odpovídal ekvivalentu ¼ váčku – 1.25 μ l včelího jedu.

Použitý hormon Peram-CAH-II (*Periplaneta americana cardioaccelerating hormone II*: pGlu-Leu-Thr-Phe-Thr-Pro-Asn-Trp-NH₂) byl syntetizován firmou Vidia Praha. Uvedený hormon byl rozpuštěn v 20 % metanolu v Ringerově roztoku o koncentraci 20 pmol/ μ l. Do

pokusného švába byly injikovány 2 μ l tedy dávka odpovídající 40 pmol hormonu (BodlÁková a kol. 2017, 2018).

V další fázi testování byl injikován stresor (včelí jed) spolu s adipokinetickým hormonem. Do těla švába za třetí končetinou byla injekčně nejprve vpravena optimální dávka včelího jedu a následně s odstupem 15 minut bylo aplikováno 40 pmol Peram-CAH-II na opačnou stranu těla.

Ke všem infikovaným skupinám byla vždy provedena i kontrola – jedinci byli injikováni pouze stejným množstvím Ringerova roztoku.

3.4. Stanovení mortality

Mortalita u testovaných jedinců *P. americana* vyvolaná působením EPN byla stanovována 24 h po injekční aplikaci. V prvním kroku bylo třeba zjistit optimální množství EPN/švába. Toto množství bylo stanoveno na hodnotu mortality asi 20 až 30 %; taková hodnota naznačuje ovlivnění fyziologických funkcí, ale zachovává dostatečné množství přeživších jedinců na pokusy. Mortalita byla zjišťována pro dávky 1000, 200-300, 100, 50, 30 a 0 jedinců EPN/švába, vždy ve skupině 20 švábů. Vytipovaná optimální dávka (30–40 EPN) byla následně ověřena pro další 3 skupiny švábů s 20 jedinci. Výsledky byly odečítány vždy 24 hodin po aplikaci.

Mortalita způsobená včelím jedem byla zjišťována obdobně. Nejprve bylo testováno vhodné množství včelího jedu. Celkem byla testována vždy skupina 30 jedinců pro každou dávku (2 vÁčky (10 μ l), 1 vÁček (5 μ l), $\frac{3}{4}$ vÁčku (3.75 μ l), $\frac{1}{2}$ vÁčku (2.5 μ l), $\frac{1}{4}$ vÁčku (1.25 μ l). Dávka 1.25 μ l se jevila jako nejvhodnější, a proto byl test na mortalitu ověřen pro tuto dávku.

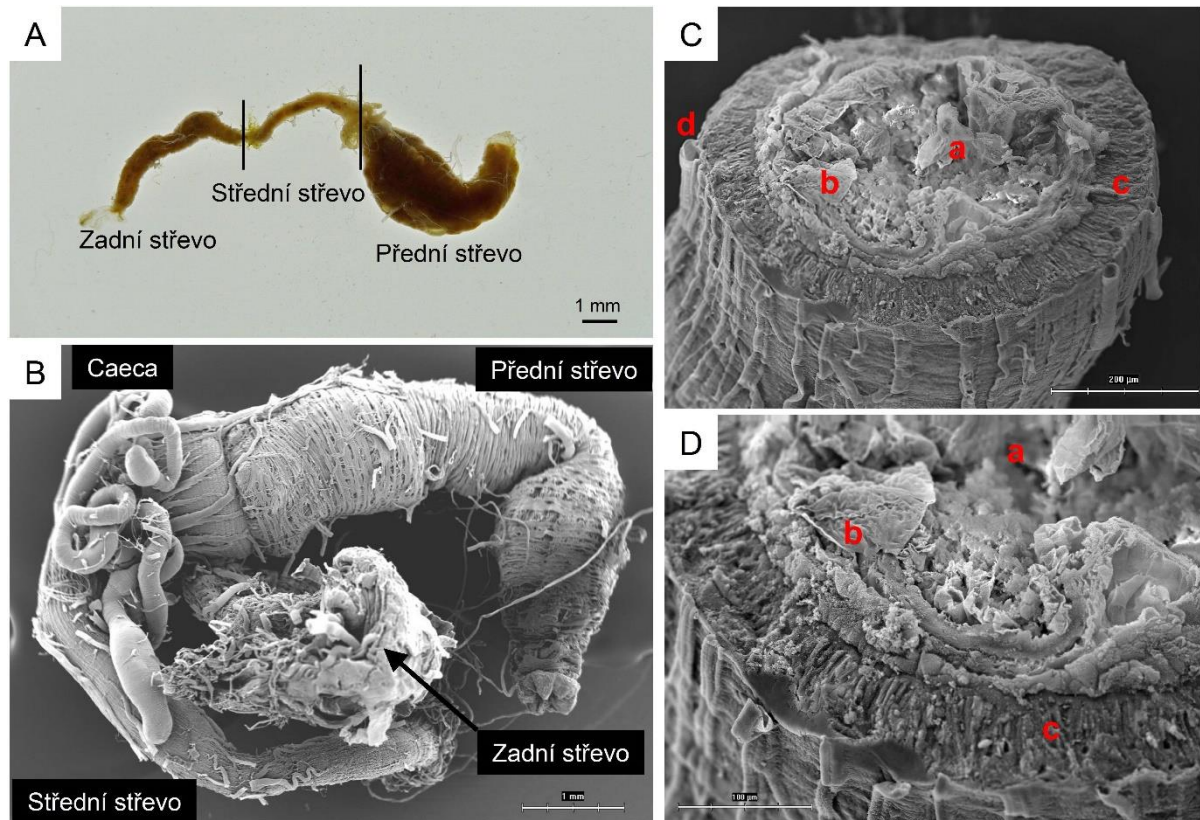
3.5. Pitva švába amerického *P. americana*

Před zahájením pitvy byli švábi, drženi ve velké 5 l sklenici, umístěni na 5-10 minut na led, aby se působením chladu snížila jejich pohybová aktivita. Vlastní pitva probíhala s pomocí voskové misky, malých nůžek, 2 pitevních pinzet a špendlíků pod binokulárním pitevním mikroskopem. Před zahájením vlastní pitvy byly ustřiženy všechny páry nohou pro usnadnění práce.

3.5.1. Střevo

Tělo švába bylo přichyceno pomocí dvou špendlíků u horní části hrudi a u zadečku dorzální stranou k voskové misce. Pomocí nůžek byla tělní stěna spolu s kutikulou (nebuněčná vrstva kryjící povrch těla převážně s ochrannou funkcí) rozstřižena a následně přišpendlena na

woskovou miskou, čímž se odkryla tělní dutina švába. Všechny orgány byly obaleny tukovým tělesem, které bylo třeba odstranit. Během pitvy byl průběžně přidáván Ringerův fyziologický roztok, aby tělo nevyschlo a nedošlo k poškození vnitřních orgánů. Pomocí pinzet bylo z těla vyjmuto celé střevo (Obr. 3) a následně oddělen mesenteron (střední střevo). Střední střevo bylo dodatečně očištěno od zbytků tukového tělesa a trachejí dýchací soustavy. Takto připravené vzorky byly vloženy do předem zvážených mikrozkušavek (Eppendorf). Vzorky byly zváženy a umístěny do mrazničky k dalšímu použití.



Obr. 3. Anatomie střeva švába amerického *P. americana*. A – celkový pohled na trávicí soustavu. B – detailní anatomie trávicí soustavy. C – řez středním střevem s tráveninou a s buňkami produkujícími trávicí enzymy. D – detail trávicích buněk s peritrofickou membránou. B,C,D – skenovací elektronový mikroskop; a – střevní obsah, b – peritrofická membrána, c- buňky střevního epitelu, d – vzdušnice; měřítko – délka úseček: B – 1 mm, C – 200 µm, D - 100 µm. Vlastní foto na skenovacím elektronovém mikroskopu HR SEM Jeol JSM-7401F v Laboratoři elektronové mikroskopie Parazitologického ústavu BC AVČR v Českých Budějovicích (spolupráce s Doc. Františkem Weydou).

3.5.2. Mozek

Od těla byla pomocí nůžek oddělena hlava a vložena do Ringerova roztoku na voskovou mističku. Pomocí pinzet byla narušena celistvost hlavy a následně odtržena svrchní část.

Pomocí Ringerova roztoku byly vymyty zbytky tukového tělesa. Poté byl z hlavy vyjmut mozek spolu s corpora cardiaca a corpora allata. Vypitvané mozky byly uloženy do mikrozkušavek s 200 μ l 80 % metanolu.

Po skončení pitev byly mozky sonikovány a centrifugovány (4 °C, 5 minut, 10 000 otáček). Následovalo odebrání supernatantu a k sedimentu bylo znovu dopipetováno 200 μ l metanolu. Celý proces extrakce byl zopakován. Výsledný vzorek bylo třeba odpařit (alespoň 3 hodiny) pomocí vakuové odpařovačky s centrifugou (SpeedVack). Po odpaření byly vzorky uloženy do mrazničky.

3.6. Extrakce enzymů ze středního střeva

1. extrakční pufr pro amylázy – fosfátový pufr pH 5.7 s přídavkem 20 mM NaCl (93.5 ml KH_2PO_4 a 6.5 ml NaH_2PO_4), ke 100 ml pufru bylo přidáno 2.05 ml NaCl.

2. extrakční pufr pro proteázy a lipázy – 0.2M Tris pH 7.8

Ze středního střeva (mesenteron) švába bylo třeba po pitvě extrahovat testované enzymy. Vlastní extrakce enzymů byla prováděna v příslušném pufru (viz výše), přičemž vzorky byly neustále uchovávány na ledě, aby nedošlo k degradaci testovaných enzymů. Ke každému vzorku bylo přidáno 200 μ l (pro amylázy) a 500 μ l (pro proteázy a lipázy) pufru a v něm byla následně tkáň rozdrčena pomocí jehlového sonikátoru (15–20 sekund). Po sonikaci byly vzorky odstředěny v centrifuze (2 minuty, 10 000 otáček). Následně byly supernatanty odpipetovány do nové sady eppendorfek a umístěny do mrazničky k dalšímu použití.

3.7. Stanovení enzymatické aktivity

3.7.1. Stanovení amylázové aktivity pomocí rozpustného škrobu

Aktivita amyláz byla stanovována metodou podle Bernfelda (1955) modifikovanou v práci Kodrůka a kol. (2012) a pro situaci ve střevě u švába *P. americana* upravenou v práci Bodlákova a kol. (2017).

Reagencie:

- DNS (kyselina 3,5-dinitrosalicylová) - 0,0125g, K-Na tartare x 4H₂O - 7,5g, NaOH - 0,4g
- 2% škrob (rozpustný ve vodě)
- fosfátový pufr pH 5,7 + 20 mM NaCl (viz výše)

Nejprve byly připraveny potřebné reagencie. DNS, K-Na tartare.4H₂O a NaOH bylo rozpuštěno v 10 ml destilované H₂O a poté doplněno pomocí pipety na 25 ml. Substrátový

roztok byl připraven dalším zředěním 2% roztoku škrobu v poměru 1:1 pomocí fosfátového pufru s 20mM NaCl. Vlastní amylázová reakce byla provedena v eppendorfci, kde bylo smícháno 25 μ l substrátového roztoku škrobu a 25 μ l vzorku, který ve většině případů odpovídal 0.005 ekvivalentu celého střeva. Pokusná sada vždy obsahovala také slepý vzorek (blank), který obsahoval pouze 25 μ l škrobového roztoku a 25 μ l fosfátového pufru. Všechny takto připravené vzorky se inkubovaly 40 minut při 30 °C. Reakce byla zastavena přidáním 200 μ l DNS reagentu. V dalším kroku se eppendorfky povařily 5 minut při 100 °C v blokovém termostatu a po jejich ochlazení se centrifugovaly 10 minut při 10 000 otáčkách. Ekvivalent 200 μ l supernatantu každého vzorku byl přepipetován do 96jamkové mikrodestičky a měřila se absorbance roztoků při 550nm na ELISA čtečce. Výsledky byly dále přepočteny na miligram maltózy/miligram hmotnosti střeva (Bodláková a kol., 2017, 2018).

3.7.2. Stanovení proteázové aktivity pomocí resorufin – kaseinu

Aktivita proteáz byla stanovena pomocí resorufin kaseinového kitu firmy Roche a k němu přiloženého návodu. Pro střevo švába *P. americana* byl postup upraven v práci Bodláková a kol. (2018).

Reagencie:

- 0,2M Tris, pH 7,8
- 0,02M CaCl₂
- 0,4% resorufin kasein (rozpuštěný ve vodě)
- 5% kyselina trichloroctová (TCA)

Nejprve byly připraveny potřebné reagencie. Vlastní proteázová reakce byla prováděna v eppendorfci, kde se smíchalo 20 μ l 0,02M CaCl₂, 20 μ l resorufin kaseinu a 60 μ l vzorku extrahovaného v 0,2M Trisu. Pokusná sada vždy obsahovala také slepý vzorek (blank), který obsahoval 20 μ l 0,02M CaCl₂, 20 μ l resorufin kaseinu a 60 μ l 0,2M Trisu. Všechny takto připravené vzorky byly inkubovány 1 hodinu při 37°C. Reakce byla zastavena přidáním 240 μ l kyseliny trichloroctové a následovala inkubace dalších 10 minut. V dalším kroku byly eppendorfky centrifugovány 3 minuty při 10 000 otáčkách. Ekvivalent 300 μ l supernatantu každého vzorku byl přepipetován do 96jamkové mikrodestičky a byla změřena absorbance roztoků při 490 nm na ELISA čtečce. Výsledky byly vyjádřeny v relativní absorbanci na mg hmotnosti střeva.

3.7.3. Stanovení lipázové aktivity pomocí kinetické fluorescence

Aktivitu lipáz byla měřena metodou podle Robertse (1985). Pro střevo švába *P. americana* byl postup upraven v práci Bodláková a kol. (2018)

Reagencie:

- 0,2M Tris, pH 7,8
- 50mM 4MU-butyrate (MW=246,26) – 0,0123 gramů substrátu bylo rozpuštěno v 1 ml DMSO, roztok byl rozpipetován po 40 μ l a skladován v tmavých eppendorfkách při teplotě - 20 °C, na test se vzorek ředí 25x.

Nejprve byly připraveny potřebné reagencie. Vlastní lipázová reakce byla prováděna v tmavých destičkách, kde byl smíchán vzorek s 0,2M Trisem tak, aby součet objemů byl 195 μ l (pro testy byla brána 1/1000 orgánu). Pokusná sada vždy obsahovala také slepý vzorek (blank), který obsahoval 195 μ l 0,2M Trisu. Ke všem vzorkům bylo přidáno 5 μ l substrátu 50mM 4MU-butyrate v DMSO. Lipázová aktivita byla měřena kinetickou fluorescencí 327nm/449nm exc/em. Výsledky byly následně převedeny na nmol 4MU/miligram hmotnosti střeva podle práce Bodlákova a kol. (2018).

3.8. Stanovení hladiny AKH

Hladina adipokinetických hormonů v extraktu z mozku švába byla měřena pomocí kompetitivního ELISA testu (Goldsworthy a kol., 2002). Použitá primární protilátka byla původně připravena proti Pyrap-AKH (hormonu z ploštice ruměnice pospolné, *Pyrrhocoris apterus*), reaguje však dobře s oběma adipokinetickými hormony švába (viz Goldsworthy a kol., 2002).

Použité reagencie:

- Aplikační pufr = Na₂CO₃ – 0,424 g + NaHCO₃ – 0,504 g na 100 ml, pH=9,6
- Promývací pufr (WB+) = 10 mM PBS (zásobní roztok o složení NaH₂PO₄ × 12 H₂O, KH₂PO₄ ředěný 1:9 na pracovní roztok) + 0,1 ml Tween/100 ml WB, pH=7,5
- mléko – Skimmed milk (Blocking buffer)
- Promývací pufr bez Tweenu (WB-)
- BLAM = roztok Cys1 – Pyrap-AKH – BLAM značeného biotinem (Biotin Long Arm Maleimide; Vector Laboratories, Petebrough, UK)
- HRPS – Horseradish Peroxidase Streptavidin
- substrát - 3, 3', 5, 5' – tetrametylbendidine
- 0.5 M H₂SO₄

Postup:

První krok byl proveden den před samotným měřením – navázání primární protilátky IgG III proti adipokinetickým hormonům přes noc při teplotě 4 °C v 96 jamkové destičce v množství 100µl/jamku (ředění 1:5000 v aplikačním pufru). Následující den byla destička 3x promyta pomocí WB+. V třetím kroku byla vyblokována volná místa pomocí 5% roztoku mléka ve WB+ v množství 200µl/ jamku – inkubace probíhala 2 hodiny při 37 °C. Po inkubaci byla destička znovu 3x promyta pomocí 200µl WB+.

V dalším kroku byly na destičku nanášeny vzorky, standardy hormonu Peram-CAH-II na konstrukci kalibrační křivky v rozmezí 640 – 0.019 pmol, pozitivní kontrola a negativní kontrola. Do každé jamky byl přidán značený antigen – tedy Cys1-AKH-BLAM, což je AKH s navázaným biotinem (Biotin Long Arm Maleimide). Testovaný antigen ve vzorku zde soutěží s označeným antigenem – měl by se vázat slaběji než testovaný, což znamená že testovaný vytěsni vazbou antigen značený. V pozitivní kontrole se první protilátka váže pouze se značeným antigenem, oproti tomu v negativní kontrole nedochází k vazbě antigenu vůbec. Vzorky byly po přípravě opět inkubovány po dobu 1 hodiny při 37 °C. Po inkubaci byla destička promyta pomocí WB+.

V dalším kroku byl do destičky aplikován HRPS (Horse Radish Peroxidase Streptavidin) v množství 100µl/ jamku (zředěno 1:500 ve WB+). Jedná se o reagent, ve které se streptavidinová část molekuly váže na biotin ve značeném antigenu. Destička byla znovu inkubována 1 hodinu. Po inkubaci byla celkem 6x promyta a následně byl přidán substrát 3,3',5,5' - tetrametylbenzediene. Destička byla následně obalena alobalem, aby 40minutová inkubace probíhala ve tmě, aby nedocházelo k reakci na světlo. Po inkubaci byla reakce zastavena přidáním 50µl 0.5M H2SO4/jamku a byla změřena absorbance na ELISA readeru (Obr. 4) při 450 nm. Čím slabší byl signál, tím více testovaného antigenu se navázalo.

Z naměřených hodnot bylo vypočteno procento kompetice podle následujícího vzorce a s pomocí kalibrační křivky stanovena hladina AKH ve vzorcích:

$$\% \text{ kompetice} = ((\text{test.Abs} - \text{pozadí}) / (\text{max.Abs} - \text{min.Abs})) * 100$$



Obr. 4. ELISA čtečka Spectra Max 340 PC, Molecular Devices, USA.

3.9. Zpracování výsledků

Výsledky byly zpracovány v programu Microsoft Excel a grafy byly sestrojeny pomocí GraphPad Software verze Prism 6 (San Diego, California). Pro porovnání výsledků uvedených níže byl použit Studentův t-test (Obr. 5-8) a jednocestná ANOVA s Tukeyho post-testem (Obr. 9-11) na 5 % hladině průkaznosti. Počet opakování pro každou skupinu byl $n=8-10$.

4. Výsledky

4.1. Vliv EPN na mortalitu

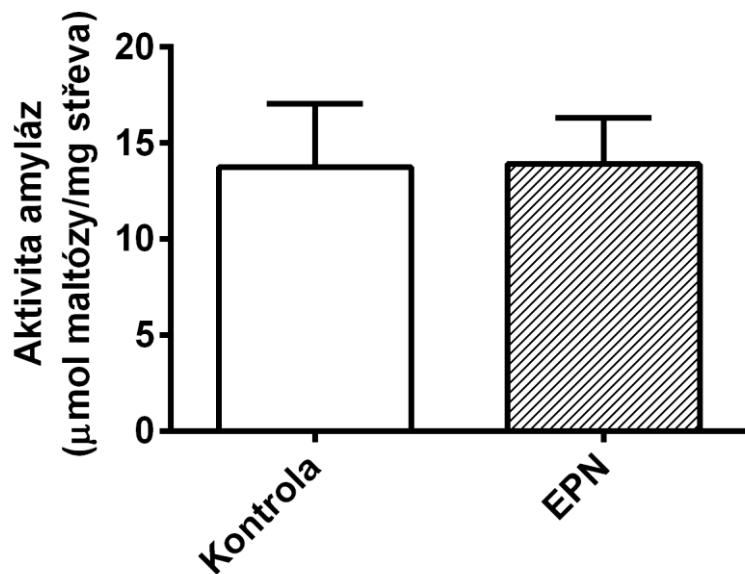
V první sérii experimentů byl zkoumán vliv entomopatogenní nematody *S. carpocapsae* (EPN) na vybrané procesy v těle švába amerického. Nejprve byla stanovena mortalita za 24 hodin po injekci, čímž byla zjištěna optimální dávka EPN pro následující pokusy (Tab. 1). Mortalita u vysokých dávek EPN (injekce 1000 jedinců EPN/švába) dosahovala 100% již během 12 hodin od aplikace. Jako nejvhodnější se jevila dávka 30-50 EPN/švába, kdy se mortalita pohybovala kolem 30 %.

Tab. 1: Vliv počtu EPN na mortalitu u švába *P. americana*.

POČET EPN/ŠVÁBA	MORTALITA BĚHEM 24 HODIN
1000	100 %
200-300	100 %
100	62 %
50	35 %
30	22 %
0 (kontrola)	5 %

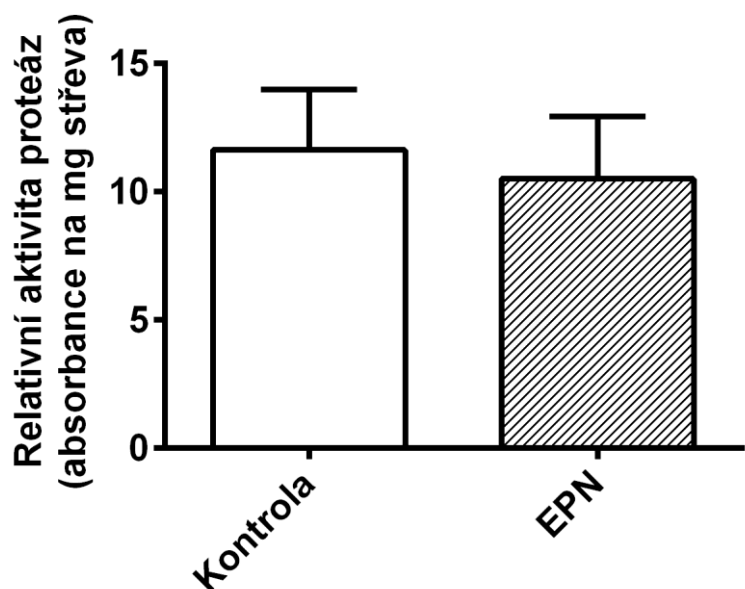
4.2. Vliv infekce EPN na aktivitu trávicích enzymů

Po zjištění optimální dávky jsem se zabývala otázkou, do jaké míry může být aktivita střevních enzymů ovlivněna aplikací EPN. V první sérii bylo do těla švába injikováno 30-40 EPN. Obr. 5 shrnuje výsledky aktivity amyláz po této aplikaci: aktivita střevních amyláz u takto ošetřených švábů byla srovnatelná s kontrolními jedinci (bez stresoru) a nejevila žádný statisticky významný stimulační ani inhibiční účinek.

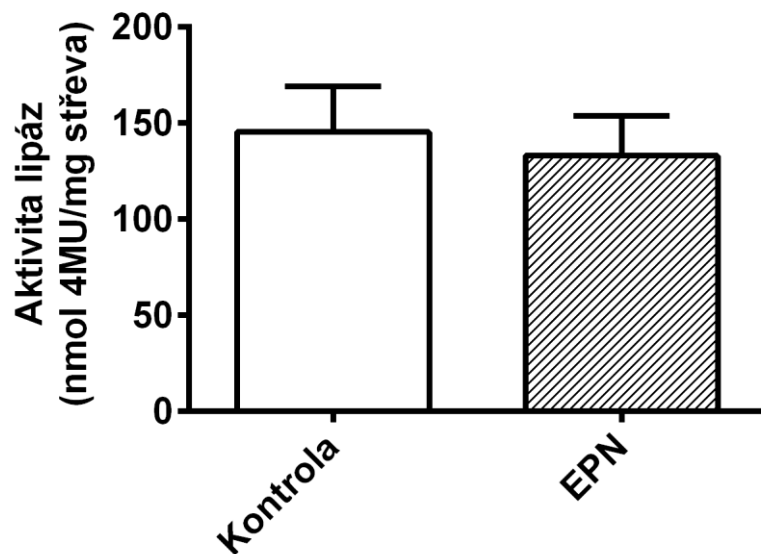


Obr. 5. Vliv injekce EPN na aktivitu amyláz ve střevě švába *P. americana*. Nebyl zjištěn statistický rozdíl mezi hodnotami pomocí Studentova t-testu na 5% hladině významnosti; n=8.

Podobný výsledek jsem zaznamenala při sledování vlivu EPN na aktivitu proteáz (Obr. 6) a lipáz (Obr. 7). Oproti amylázám lze zde pozorovat mírný inhibiční trend – EPN snižují aktivitu těchto střevních enzymů. Výsledky ale nebyly statisticky průkazné. Obecně lze tedy říct, že aplikace EPN nemá žádný zásadní účinek na aktivitu střevních enzymů.



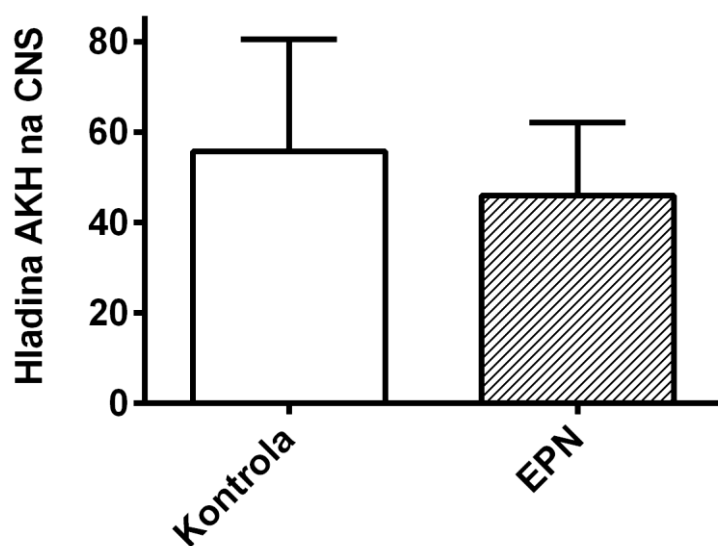
Obr. 6. Vliv injekce EPN na aktivitu proteáz ve střevě švába *P. americana*. Nebyl zjištěn statistický rozdíl mezi hodnotami pomocí Studentova t-testu na 5% hladině významnosti; n=8.



Obr. 7. Vliv injekce EPN na aktivitu lipáz ve střevě švába *P. americana*. Nebyl zjištěn statistický rozdíl mezi hodnotami pomocí Studentova t-testu na 5% hladině významnosti; n=8.

4.3. Vliv infekce EPN na CNS

Pro následné ověření efektu EPN na švába *P. americana* jsem měřila vliv EPN na CNS. Konkrétně se jednalo o stanovení hladiny adipokinetických hormonů v extraktu z mozků švába pomocí kompetitivního ELISA testu. Ani zde ale nebyly získány statisticky významné rozdíly mezi injikovanými jedinci a kontrolami. Hladina byla srovnatelná pro obě skupiny (Obr. 8), což potvrzuje i trend zjištěný u střevních enzymů.



Obr. 8. Hladina AKH u švába *P. americana* 24 hodin po injekční aplikaci 40 EPN. Nebyl zjištěn statistický rozdíl mezi hodnotami pomocí Studentova t-testu na 5% hladině významnosti; n=8.

4.4. Vliv infekce včelího jedu na mortalitu

V druhé fázi experimentů jsem zkoumala vliv včelího jedu na mortalitu. K vytipování vhodné dávky jedu byla zase použita mortalita, ta logicky klesala se snižující se dávkou včelího jedu (Tab. 2). Po injekční aplikaci 10 μ l jedu byla mortalita 100% již během 12 hodin. Oproti tomu pro ekvivalent 1.25 μ l se mortalita za 24 hod pohybovala kolem 20%.

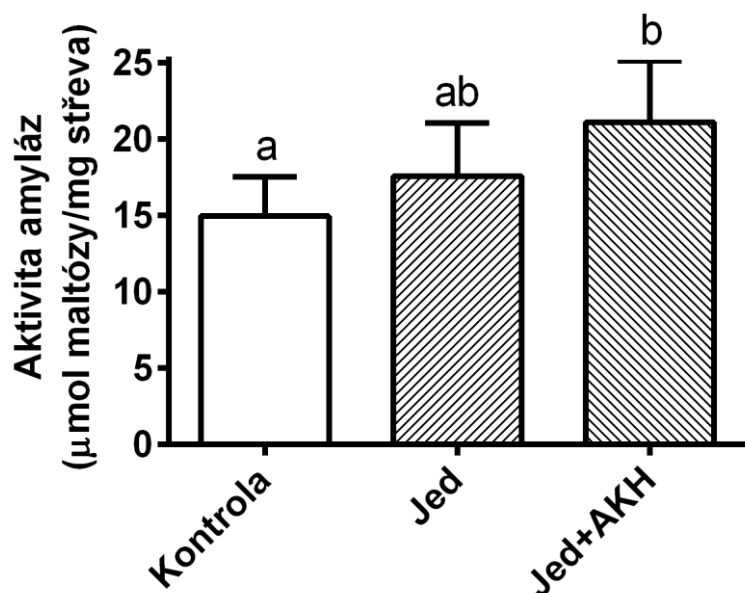
Tab. 2: Vliv včelího jedu na mortalitu švába *P. americana*.

MNOŽSTVÍ JEDU/JEDINCE	MORTALITA
10 μ l (2 váčky)	100 %
5 μ l (1 váček)	77 %
3.75 μ l (3/4 váčku)	63 %
2.5 μ l (1/2 váčku)	47 %
1.25 μ l (1/4 váčku)	22 %
0 μ l (kontrola)	3.3 %

4.5. Vliv včelího jedu na aktivitu trávicích enzymů

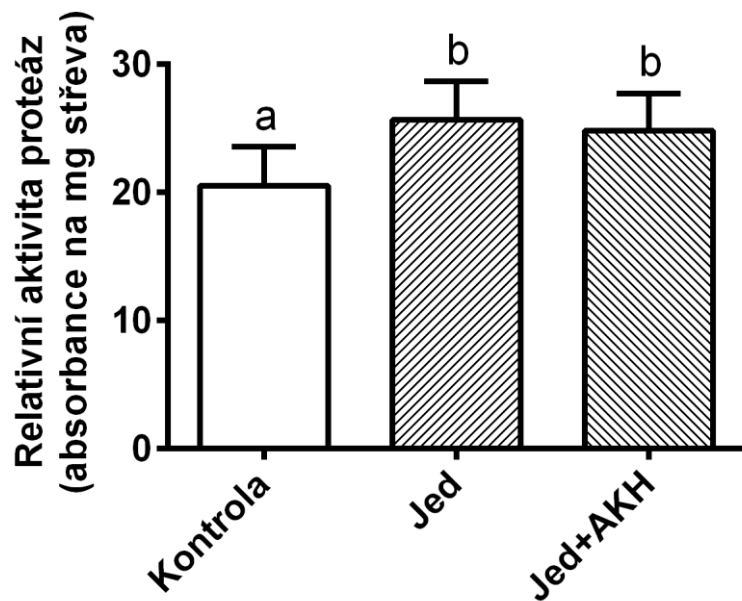
Z výsledků v Tab. 2 byla vybrána optimální dávka včelího jedu 1.25 μ l, která odpovídá ekvivalentu 1/4 váčku. Tato dávka byla následně použita pro stanovení vlivu včelího jedu na aktivitu trávicích enzymů ve střevě. Byla injikována buď samostatně nebo spolu se 40 pmol

Peram-CAH-II, aby byl sledován případný vliv AKH na interakci jedu s trávicími procesy. V první sérii pokusů byl zjišťován vliv na aktivitu střevních amyláz. Z Obr. 9 je patrné, že nejvyšší nárůst aktivity byl zaznamenán po aplikaci včelího jedu spolu s adipokinetickým hormonem – 1.5x oproti kontrolám. Samotný jed sice aktivitu amyláz mírně stimuloval, ale tato stimulace nebyla průkazná



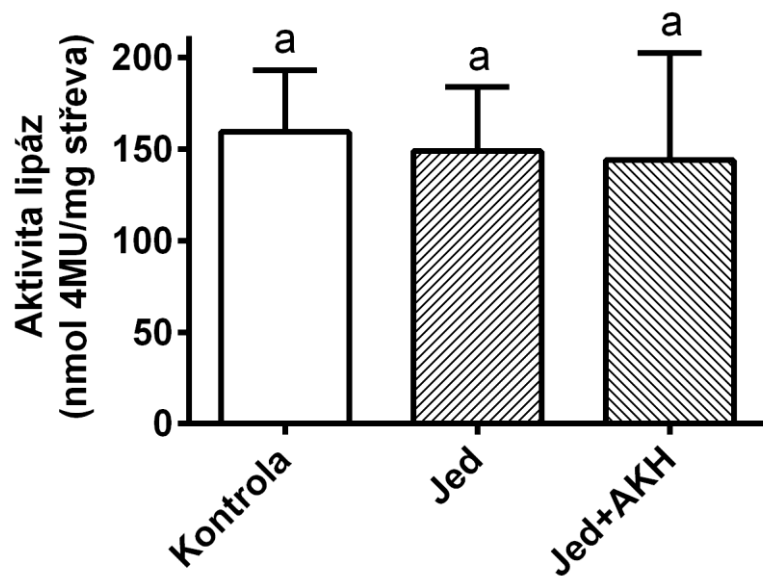
Obr. 9. Vliv injekce 1.25 μl včelího jedu a včelího jedu spolu s 40 pmol adipokinetického hormonu Peram-CAH-II na aktivitu amyláz ve střevě švába *P. americana*. Statisticky významné rozdíly na 5% hladině významnosti testované jednocestnou analýzou variance (ANOVA) s Tukeyho post testem jsou označeny odlišnými písmeny nad sloupci; n=9.

Stejným způsobem byla změřena také aktivity střevních proteáz. U těchto enzymů došlo ke statisticky průkaznému nárůstu po aplikaci nejen včelího jedu (asi 1,2x), ale také včelího jedu spolu s adipokinetickým hormonem (asi 1,2x). Nebyl však zaznamenán rozdíl mezi oběma pokusnými skupinami (Obr. 10).



Obr. 10. Vliv injekce 1.25 μ l včelího jedu a včelího jedu spolu s 40 pmol adipokinetického hormonu Peram-CAH-II na aktivitu proteáz ve střevě švába *P. americana*. Statisticky významné rozdíly na 5% hladině významnosti testované jednocestnou analýzou variance (ANOVA) s Tukeyho post testem jsou označeny odlišnými písmeny nad sloupci; n=9.

Poslední měřenou charakteristikou byl vliv jedu a hormonu na aktivitu lipáz (Obr. 11). U této jako jediné skupiny nedošlo k žádným průkazným změnám enzymové aktivity po aplikaci testovaných látek.



Obr. 11. Vliv injekce 1.25 μ l včelího jedu a včelího jedu spolu s 40 pmol adipokinetického hormonu Peram-CAH-II na aktivitu lipáz ve střevě švába *P. americana*. Nebyl prokázán statisticky významný rozdíl na 5% hladině významnosti, který byl testován jednocestnou analýzou variance (ANOVA) s Tukeyho post testem (stejná písmena nad sloupci); n=9.

5. Diskuze

Šváb americký *Periplaneta americana* je obecně známý jako živočich, který disponuje celou řadou schopností – dokáže přežít až měsíc bez potravy, 14 dní bez vody, a dokonce týden bez hlavy. Po týdnu umírá nikoliv na to, že by mu hlava chyběla, ale na vyschnutí. Mimo to je o něm známo, že dokáže přežít i vyšší dávky radioaktivity. Bylo proto velmi zajímavé zkoumat, jakým způsobem bude reagovat na přírodní stresory – v tomto případě na entomopatogenní nematody a včelí jed.

O odolnosti mého modelového druhu vůči infekci entomopatogenními nematody (EPN) svědčí výsledky mortalitních křivek, které sloužily také jako stanovení optimálního počtu EPN pro další fyziologické pokusy. Jak vyplynulo z předchozích studií naší skupiny s jinými toxiny a patogeny, taková optimální dávka by měla vyvolat mortalitu okolo 20 až 30% (Ibrahim a kol., 2017; Karbusová a kol., 2019). Taková dávka se u švába *P. americana* pohybovala v rozmezí 30–40 EPN/jedince. Zajímavé je v tomto případě srovnání s aplikací EPN do plošnice *Pyrrhocoris apterus*, u které se vhodná dávka pohybovala kolem 10 EPN při injekční aplikaci a 100 EPN při topikální aplikaci (Ibrahim a kol., 2017). Při této dávce se mortalita u plošnice pohybovala v průměru okolo 20% po 24 hodinách pro topikální aplikaci a dokonce 60% pro injekční aplikaci; u švába amerického jsem zjistila mortalitu po aplikaci 30-40 EPN maximálně 25%. Jistá variability mortality by mohla být způsobena právě toxicitou EPN, která koreluje s jejich stářím. Proto bylo potřeba stanovovat mortalitu před každou sérií pokusů. Jako nejvhodnější se jeví asi týden staří infekční juvenilní jedinci. Právě kolísání toxicity hlístic je popsáno v práci Lua a kol. (2017), kteří se zabývali infikováním cvrčků *Acheta domesticus* pomocí entomopatogenních hlístic *Steinernema scapterisci*.

Z mých výsledků spojených s intoxikací EPN dále vyplynulo, že nevyvolává téměř žádné zvýšení hladiny adipokinetického hormonu (AKH) v mozku. To je zajímavé, jelikož množství AKH, které je obsaženo v mozku a přídatných gangliích (corpora cardiaca), by se mělo měnit, pokud je organismus vystaven nějakému stresoru (Candy, 2002; Kodrík a kol., 2010). Zvýšení hladiny AKH po aplikaci EPN bylo zaznamenáno i u *P. apterus* (Ibrahim a kol., 2017). Míra změn v organismu po působení stresoru je způsobena nejen jeho intenzitou, ale také typem stresu a je rozdílná v závislosti na druhu – o tom pojednává i souhrnná práce, ve které se aplikovalo spektrum toxinů, jež způsobilo mnohanásobné navýšení hladiny AKH v mozku i hemolymfě (Kodrík a kol., 2015b). Proč nedošlo u švába po aplikaci EPN ke zvýšení hladiny AKH není zcela jasné.

Samotná aplikace EPN nezpůsobila ani žádné výrazné zvýšení aktivity střevních enzymů. Je všeobecně známo, že u hmyzu enzymatická výbava odpovídá typu přijímané potravy. Švába americká je omnivorní živočich, jeho potrava je velmi pestrá a dokáže strávit i celulózu. Vlastní enzymatické trávení se děje ve středním střevě (mesenteron). Předpokládá se, že na řízení enzymatického trávení se podílí i hormony – kromě typicky hmyzích hormonů se tohoto procesu účastní i tkáňové hormony produkované střevními buňkami (Audsley a Weaver, 2009). Výzkumy také prokázaly, že se do tohoto procesu řízení zapojují právě i adipokinetické hormony (AKH) – toto zapojení bylo objasněno u ploštice *P. apterus* (Kodrík a kol., 2012; Vinokurov a kol., 2014), mouchy *Sarcophaga crassipalpis* (Bil a kol., 2014) a také u švába *P. americana* (Bodláková a kol., 2017, 2018). Právě v mých předchozích pracích byla popsána přímá stimulace střevních enzymů prostřednictvím AKH. Případný vliv EPN resp. AKH na fyziologické procesy švába není z pohledu mých výsledků zcela jasný.

Výsledky druhého stresoru, kterým byl včelí jed, ukázaly výrazné zvýšení mortality po injekční aplikaci celého včelího jedu. Bylo proto třeba vytipovat dávku, při které by se mortalita pohybovala kolem 25 %. Ukázalo se, že této mortality bylo dosaženo po aplikaci 1.25 μ l jedu. Oproti aplikaci EPN došlo u tohoto jedu k částečnému navýšení enzymatické aktivity ve střevě – alespoň u amyláz a proteáz. To naznačuje jistý vliv AKH, nicméně jeho interpretace není jasná. Je třeba mít na paměti, že k výraznému nárůstu aktivity střevních enzymů dochází po aplikaci samotných adipokinetických hormonů, jak jsem zjistila v mých předchozích pracích (Bodláková a kol., 2017, 2018). V nich jsme prokázali přímý efekt Peram-CAH-I i -II na trávení u švába *P. americana*, kdy např. po aplikaci hormonu Peram-CAH-II došlo až k osminásobnému nárůstu amylázové aktivity. Zároveň ale nedošlo ke stejnému nárůstu u všech testovaných enzymů – což by nasvědčovalo tomu, že nejen adipokinetické hormony, ale také jednotlivé stresory působí selektivně – pro každý enzym zvyšují aktivitu rozdílně. Tento fakt byl popsán i u řady jiných aktivit, které byly řízeny pomocí AKH. Například u ploštice *P. apterus* bylo zjištěno, že dávka 10 pmol AKH (Pyrap-AKH) vyvolá maximální navýšení hladiny tuků v hemolymfě a vyšší dávky hormonů už tak účinné nejsou (Kodrík a kol., 2000).

Zajímavé je také srovnání se studií Karbusová a kol. (2019), ve které se autoři zabývali studiem a vlivem různých toxinů právě na trávicí enzymy u švába amerického – konkrétně se jednalo o jed z vosičky *Habrobracon hebetor* a toxin destruxin A z entomopatogenní houby *Metarhizium anisopliae*. V této práci se ukázalo, že vosičkový jed neměl na aktivitu trávicích enzymů žádný vliv stejně jako EPN v mé bakalářské práci. Oproti tomu destruxin A způsobil

pokles aktivity všech výše zmíněných enzymů a kombinace s hormonem nezpůsobila žádný výrazný nárůst. Lze tedy předpokládat, že na různé toxiny reaguje šváb americký *P. americana* různými mechanismy – zvýšení či snížení enzymatické aktivity, a to i v kombinaci s adipokinetickými hormony.

Adipokinetické hormony se jeví jako velmi zajímavý cíl dalšího výzkumu – v posledních letech se zkoumá jejich praktické využití jako potenciálních insekticidů ke kontrole populací škodlivých hmyzích zástupců (Gäde a Goldsworthy, 2003; Kodrík a kol., 2015c), ale také jejich použití související s jejich proti-obézními (Gáliková a kol., 2017) či dokonce neuroprotektivními (Mutlu a kol., 2018; Shaik a kol., 2017) vlastnostmi. Právě z těchto důvodů je jejich studium velice důležité a pomáhají nám lépe pochopit nejen mechanismus jejich účinku, ale také najít všechny zatím neznámé funkce.

Zajímavé by bylo porovnat účinek různých typů stresorů (biologické, chemické, radiologické) nejen na aktivitu střevních enzymů, ale také na množství produkovaného AKH při této stresové reakci.

6. Závěr

Práce se zabývá změnami fyziologických procesů (enzymatická aktivita střeva, hladina adipokinetických hormonů) v těle švába amerického *P. americana* po ošetření entomopatogenními nematodami, a včelím jedem spolu s adipokinetickým hormonem Peram-CAH-II. Ze získaných výsledků vyplývá:

1. Aplikace EPN i včelího jedu vyvolává mortalitu jedinců švába amerického *P. americana*. Optimální dávka pro posouzení vlivu těchto stresorů na fyziologické procesy byla stanovena na 30-40 EPN, respektive 1.25 μ l včelího jedu.
2. Aktivita střevních enzymů (amylázy, proteázy, lipázy) se po aplikaci dané dávky entomopatogenních nematod významně nezvýšila.
3. Hladina AKH měřená pomocí testu ELISA nezaznamenala podstatné rozdíly mezi kontrolními a EPN ošetřenými jedinci.
4. Aktivita střevních amyláz byla průkazně zvýšena (1.5x) po aplikaci včelího jedu spolu s adipokinetickým hormonem. Aplikace samotného jedu významný nárůst amylázové aktivity nepřinesla.
5. Aktivita střevních proteáz byla mírně, ale signifikantně zvýšená po aplikaci jedu samotného i jedu s AKH; aktivita střevních lipáz se po aplikaci zmíněných agens neměnila.
6. Zdá se, že AKH hraje v reakci trávicích enzymů na ošetření včelím jedem jistou roli, její podstata však není zcela jasná.

7. Seznam použité literatury

Adamo, S. A. (2017). The stress response and immune system share, borrow, and reconfigure their physiological network elements: Evidence from the insects. *Hormones and Behavior*, 88, 25–30.

Adams, B. J., Fodor, A., Koppenhöfer, H. S., Stackebrandt, E., Patricia Stock, S., & Klein, M. G. (2006). Reprint of “Biodiversity and systematics of nematode-bacterium entomopathogens” [Biological Control 37 (2006) 32-49]. *Biological Control*, 38(1), 4–21.

Alquicer, G., Kodrík, D., Krishnan, N., Večeřa, J., & Socha, R. (2009). Activation of insect anti-oxidative mechanisms by mammalian glucagon. *Comparative Biochemistry and Physiology – B Biochemistry and Molecular Biology*, 152(3), 226–233.

Audsley, N., Weaver, R.J. (2009). Neuropeptides associated with the regulation of feeding in insects. *General and Comparative Endocrinology* 162, 93-104.

Barman, T.E. (1969), *Enzyme handbook*. Springer-Verlag, Berlin.

Bedding, R. A., & Molyneux, A. S. (1982). Penetration of insect cuticle by infective juveniles of heterorhabditis SPP. (Heterorhabditidae: Nematoda). *Nematologica*, 28(3), 354–359.

Bernfeld, P. (1955). Amylases, a and b. In: Colowick, S.P., Kaplan, N.O. (Eds.), *Methods in Enzymology*. vol. 1. Academic Press, New York, pp. 149–158.

Bil, M., Broeckx, V., Landuyt, B., Huybrechts, R. (2014). Differential peptidomics highlights adipokinetic hormone as key player in regulating digestion in anautogenous flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*. *Genetic and Comparative Endocrinology* 208, 49-56.

BodlÁková, K., Beňová, M., & KodrÍk, D. (2018). The effect of adipokinetic hormones on the activity of digestive enzymes. *Physiological Entomology*, 43(2), 140–148.

BodlÁková, K., Jedlička, P., KodrÍk, D. (2017). Adipokinetic hormones control amylase activity in the cockroach (*Periplaneta americana*) gut. *Insect Science*. DOI: 10.1111/1744-7917.12314.

Bogdanov, S. (2016). Bee venom: production, composition, quality. 1. The bee venom book. Muehlethurnen, Switzerland.

Brown, S. E., Cao, A. T., Dobson, P., Hines, E. R., Akhurst, R. J., & East, P. D. (2006). Txp40, a ubiquitous insecticidal toxin protein from *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(2), 1653–1662.

Candy, D. J. (2002). Adipokinetic hormones concentrations in the haemolymph of *Schistocerca gregaria*, measured by radioimmunoassay. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32(11), 1361–1367.

Comley, R., Lightfoot, M., & Goldsworthy, G. J. (2002). A quantitative study of adipokinetic hormone of the firebug, *Pyrrhocoris apterus* - Birkbeck ePrints. 48, 1103–1109.

Daborn, P. J., Waterfield, N., Blight, M. A., & Ffrench-Constant, R. H. (2001). Measuring virulence factor expression by the pathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens* in culture and during insect infection. *Journal of Bacteriology*, 183(20), 5834–5839.

Dobeš, P., Wang, Z., Markus, R., Theopold, U., & Hyršl, P. (2012). An improved method for nematode infection assays in *Drosophila* larvae. *Fly*, 6(2), 75–79.

Downer, R. G. H. (1979). Induction of hypertrehalosemia by excitation in *Periplaneta americana*. *Journal of Insect Physiology*, 25(1), 59–63.

Eisemann, C. H., & Binnington, K. C. (1994). The peritrophic membrane: Its formation, structure, chemical composition and permeability in relation to vaccination against ectoparasitic arthropods. *International Journal for Parasitology*, 24(1), 15–26.

Forst, S., & Neelson, K. (1996). Molecular Biology of the Symbiotic-Pathogenic Bacteria Spp, *Xenorhabdus* spp *Photorhabdus*. *Microbiological Reviews*, 60(1), 21–43.

Gäde, G. (1997). The explosion of structural information on insect neuropeptides. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, 1–128.

Gäde, G., & Goldsworthy, G. J. (2003). Insect peptide hormones: A selective review of their physiology and potential application for pest control. *Pest Management Science*, 59(10), 1063–1075.

Gäde, G., Hoffmann, K.H., Spring, J.H. (1997). Hormonal regulation in insects: facts, gaps, and future directions. *Physiological Review* 77, 963-1032.

Gáliková, M., Klepsatel, P., Xu, Y., & Kühnlein, R. P. (2017). The obesity-related Adipokinetic hormone controls feeding and expression of neuropeptide regulators of *Drosophila* metabolism. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 119(3), 1–14.

Goldsworthy, G., Chandrakant, S., & Opoku-Ware, K. (2003). Adipokinetic hormone enhances nodule formation and phenoloxidase activation in adult locusts injected with bacterial lipopolysaccharide. *Journal of Insect Physiology*, 49(8), 795–803.

Goldsworthy, G., Opoku-Ware, K., & Mullen, L. (2002). Adipokinetic hormone enhances laminarin and bacterial lipopolysaccharide-induced activation of the prophenoloxidase cascade in the African migratory locust, *Locusta migratoria*. *Journal of Insect Physiology*, 48(6), 601–608.

Goldsworthy, G. J., Opoku-Ware, K., & Mullen, L. M. (2005). Adipokinetic hormone and the immune responses of locusts to infection. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1040, 106–113.

Gotz, P., Boman, A., & Boman, H. G. (1981). Interactions between insect immunity and an insect-pathogenic nematode with symbiotic bacteria. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 212(1188), 333–350.

Grewal, P. S., Lewis, E. E., Gaugler, R., & Campbell, J. F. (1994). Host finding behaviour as a predictor of foraging strategy in entomopathogenic nematodes. *Parasitology*, 108(02), 207.

Herbert, E. E., & Goodrich-Blair, H. (2007). Friend and foe: The two faces of *xenorhabdus nematophila*. *Nature Reviews Microbiology*, 5(8), 634–646.

Chapman, R.F. (1998). *The Insects: Structure and Function*, 4th ed. Cambridge university press, Cambridge.

Chen, J., and Lariviere, W.R. (2010). The nociceptive and anti-nociceptive effects of bee venom injection and therapy: A double-edged sword. *Progress in Neurobiology* 92, 151–183.

Ibrahim, E., Dobeš, P., Kunc, M., Hyršl, P., & Kodrík, D. (2018). Adipokinetic hormone and adenosine interfere with nematobacterial infection and locomotion in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*, 107, 167–174.

Ibrahim, E., Hejníková, M., Shaik, H. A., Doležel, D., & Kodrík, D. (2017). Adipokinetic hormone activities in insect body infected by entomopathogenic nematode. *Journal of Insect Physiology*, 98, 347–355.

Karbusová, N., Gautam, U.K., Kodrík, D. (2019). Effect of natural toxins and adipokinetic hormones on the activity of digestive enzymes in the midgut of the cockroach *Periplaneta americana*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 101, e21586.

Karlson, P. (1981), *Základy biochemie*. Academia, Praha, 3. České přepracované vydání.

Kodrík, D. (2008). Adipokinetic hormone functions that are not associated with insect flight. *Physiological Entomology* 33, 171-180.

Kodrík, D., Plavším, I., Velki, M., & Stašková, T. (2015c). The potential use of metabolic neurohormones in the control of insect populations. *Physiological Days*, 91.

Kodrík, D., Socha, R., Šimek, P., Zemek, R., Goldsworthy, G.J. (2000). A new member of the AKH/RPCH family that stimulates locomotory activity in the firebug, *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30, 489-498.

Kodrík, D., Vinokurov, K., Tomčala, A., Socha, R. (2012). The effect of adipokinetic hormone on midgut characteristics in *Pyrrhocoris apterus* L. (Heteroptera). *Journal of Insect Physiology* 58, 194-204.

Kodrík, Dalibor, Bártů, I., & Socha, R. (2010). Adipokinetic hormone (Pyrap-AKH) enhances the effect of a pyrethroid insecticide against the firebug *Pyrrhocoris apterus*. *Pest Management Science*, 66(4), 425–431.

Kodrík, Dalibor, Bednářová, A., Zemanová, M., & Krishnan, N. (2015b). Hormonal Regulation of Response to Oxidative Stress in Insects—An Update. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(10), 25788–25816.

Kodrík, Dalibor, & Socha, R. (2005). The effect of insecticide on adipokinetic hormone titre in the insect body. *Pest Management Science*, 61(11), 1077–1082.

Kodrík, Dalibor, Stašková, T., Jedličková, V., Weyda, F., Závodská, R., & Pfliegerová, J. (2015a). Molecular characterization, tissue distribution, and ultrastructural localization of adipokinetic hormones in the CNS of the firebug *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera, Insecta). *General and Comparative Endocrinology*, 210, 1–11.

Lagueux, M., Perrodou, E., Levashina, E. A., Capovilla, M., & Hoffmann, J. A. (2000). Constitutive expression of a complement-like protein in Toll and JAK gain-of-function mutants of *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(21), 11427–11432.

Lehane, M.J., Billingsley, P.F. (1996). *Biology of insect midgut*. Chapman & Hall, London, UK.

Lu, D., Macchietto, M., Chang, D., Barros, M. M., Baldwin, J., Mortazavi, A., & Dillman, A. R. (2017). Activated entomopathogenic nematode infective juveniles release lethal venom proteins. *PLOS Pathogens* (Vol. 13).

Lubawy, J., Urbanski, A., Mrówczyńska, L., Matuszewska, E., Swiatły-Błaszczewicz, A., Matysiak, J. and Rosinski, R. (2019). The influence of bee venom melittin on the functioning of the immune system and the contractile activity of the insect heart-a preliminary study. *Toxins* 11, no. 494.

Martens, E. C., & Goodrich-Blair, H. (2005). The *Steinernema carpocapsae* intestinal vesicle contains a subcellular structure with which *Xenorhabdus nematophila* associates during colonization initiation. *Cellular Microbiology*, 7(12), 1723–1735.

Milde, J. J., Ziegler, R., & Wallstein, M. (1995). Adipokinetic hormone stimulates neurones in the insect central nervous system. *The Journal of Experimental Biology*, 198(6), 1307 LP – 1311.

Mutlu, O., Páleníček, T., Pinterová, N., Šíchová, K., Horáček, J., Holubová, K., ... Valeš, K. (2018). Effects of the adipokinetic hormone/red pigment-concentrating hormone (AKH/RPCH) family of peptides on MK-801-induced schizophrenia models. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 32(6), 589–602.

Olson, P. F., Fessler, L. I., Nelson, R. E., Sterne, R. E., Campbell, A. G., & Fessler, J. H. (1990). Glutactin, a novel *Drosophila* basement membrane-related glycoprotein with sequence similarity to serine esterases. *The EMBO Journal*, 9(4), 1219–1227.

Roberts, I.M. (1985). Hydrolysis of 4-methylumbelliferyl butyrate: a convenient and sensitive fluorescent assay for lipase activity. *Lipids* 20, 243-247.

Scarborough, R. M., Jamieson, G. C., Kalish, F., Kramer, J. S., McEnroe, G. A., Miller, C. A. and Schooley, D. (1984). Isolation and primary structure of two peptides with cardioacceleratory and hyperglycemic activity from the corpora cardiaca of *Periplaneta americana*. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 81, 5575–5579.

Shaik, H. A., Mishra, A., & Kodrık, D. (2017). Beneficial effect of adipokinetic hormone on neuromuscular paralysis in insect body elicited by braconid wasp venom. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology*, 196, 11–18.

Sicard, M., Ferdy, J.-B., Pagès, S., Le Brun, N., Godelle, B., Boemare, N., & Moulia, C. (2004). When mutualists are pathogens: an experimental study of the symbioses between *Steinernema* (entomopathogenic nematodes) and *Xenorhabdus* (bacteria). *Journal of Evolutionary Biology*, 17(5), 985–993.

Silva, C. P., Waterfield, N. R., Daborn, P. J., Dean, P., Chilver, T., Au, C. P. Y., ... FfrenchConstant, R. H. (2002). Bacterial infection of a model insect: *Photorhabdus luminescens* and *Manduca sexta*. *Cellular Microbiology*, 4(6), 329–339.

Snodgrass, R.E. (2018). *The Anatomy of the Honey Bee*. Pickle Partners Publishing - re-edition of Snodgrass, R.E., 1956. *Anatomy of the Honey Bee*. Comstock Publishing Associates, Ithaca.

Snyder, H., Stock, S. P., Kim, S.-K., Flores-Lara, Y., & Forst, S. (2007). New Insights into the Colonization and Release Processes of *Xenorhabdus nematophila* and the Morphology and Ultrastructure of the Bacterial Receptacle of Its Nematode Host, *Steinernema carpocapsae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(16), 5338–5346.

Socha, R., Kodrık, D., & Zemek, R. (1999). Adipokinetic Hormone Stimulates Insect Locomotor Activity. *Naturwissenschaften*, 86(2), 85–86.

Tamaki, F.K., Pimentel, A.C., Dias, A.B., Cardoso, C., Ribeiro, A.F., Fereira, C., Terra, W.R. (2014). Physiology of digestion and the molecular characterization of the major digestive enzymes from *Periplaneta americana*. *Journal of Insect Physiology* 70, 22-35.

Toubarro, D., Lucena-Robles, M., Nascimento, G., Santos, R., Montiel, R., Veríssimo, P., ... Simões, N. (2010). Serine Protease-mediated Host Invasion by the Parasitic Nematode *Steinernema carpocapsae*. *Journal of Biological Chemistry*, 285(40), 30666–30675.

Van der Horst, D. J., Van Marrewijk, W. J., & Diederer, J. H. (2001). Adipokinetic hormones of insect: Release, signal transduction, and responses.

Velki, M., Kodrík, D., Večeřa, J., Hackenberger, B. K., & Socha, R. (2011). Oxidative stress elicited by insecticides: A role for the adipokinetic hormone. *General and Comparative Endocrinology*, 172(1), 77–84.

Vinokurov, K., Bednářová, A., Tomčala, A., Stašková, T., Krishnan, N., Kodrík, D. (2014). Role of adipokinetic hormone in stimulation of salivary gland activities: the fire bug *Pyrrhocoris apterus* L. (Heteroptera) as a model species. *Journal of Insect Physiology* 60, 58-67.

Vodrážka, Z. (1999). *Biochemie*. Academia, Praha, 2. opravené vydání.

Wehbe, R., Frangieh, J., Rima, M., El Obeid, D., Sabatier, J.M., Fajloun, Z. (2019). Bee venom: overview of main compounds and bioactivities for therapeutic interests. *Molecules* 24: no 2997.

Whitten, M. M. A., Shiao, S. H., & Levashina, E. A. (2006). Mosquito midguts and malaria: cell biology, compartmentalization and immunology. *Parasite Immunology*, 28(4), 121–130.