

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

FAKULTA ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

KATEDRA EKOLOGIE



Vliv potravy během larválního vývoje a páření během dospělosti na imunitní systém: případová studie na slunéčkách

Effects of larval feeding and adult mating on insect immune system: a case study in ladybirds

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Bakalant: Daniel Bernt

Vedoucí práce: Ing. Michal Knapp, Ph.D.

2020

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta životního prostředí

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Daniel Bernt

Environmentální vědy
Aplikovaná ekologie

Název práce

Vliv potravy během larválního vývoje a páření během dospělosti na imunitní systém: případová studie na slunéčkách

Název anglicky

Effects of larval feeding and adult mating on insect immune system: a case study in ladybirds

Cíle práce

Cílem práce bude vypracovat literární rešerši popisující problematiku imunitní systém hmyzu a faktory, které jej zásadně ovlivňují. Dalším cílem práce bude realizace laboratorního experimentu, který bude zkoumat vliv potravy během larválního vývoje (dostatek vs. nedostatek) a páření během dospělosti (žádné vs. pravidelné) na imunitní systém slunéčka východního (*Harmonia axyridis*).

Metodika

Literární rešerše bude vypracována především na základě vědeckých článků vyhledaných na Web of Knowledge. Literární rešerše uvede čtenáře do problematiky imunitního systému hmyzu (hlavní komponenty, podobnosti a odlišnosti s obratlovci). Detailněji by se rešerše měla zabývat faktory ovlivňujícími imunitní systém a investice jedince do svého imunitního systému (vliv potravy, patogenů, reprodukčního úsilí, stárnutí organismu atd.). Laboratorní experiment bude zkoumat vliv hladovění během larválního vývoje a páření během dospělosti na imunitní systém (počet hemocytů, antimikrobiální aktivitu proti *Escherichia coli*) slunéčka východního (*Harmonia axyridis*). Metodika měření bude použita obdobná, jako byla již aplikována v předchozích studiích realizovaných v naší laboratoři (např. Řeřicha et al. 2018). Odběr hemolymfy bude realizován opakovaně, nejméně dvakrát (jednou ihned po vykuklení jedince a poté později v průběhu jeho života).

Doporučený rozsah práce

30-40 stran + přílohy dle potřeby

Klíčová slova

imunitní systém, počet hemocytů, páření, pohlavní dimorfismus

Doporučené zdroje informací

Hořejší V et al. (2013): Základy imunologie. Triton, Praha.

Keehnen NLP et al. (2017): Insect Antimicrobial Defences: A Brief History, Recent Findings, Biases, and a Way Forward in Evolutionary Studies. *Advances in Insect Physiology* 52: 1-33.

Loof TG et al. (2011): Coagulation systems of invertebrates and vertebrates and their roles in innate immunity: The same side of two coins? *J. Innate Immun.* 3: 34–40.

Rolff J (2002): Bateman's principle and immunity. *Proc. R. Soc. Lond. B* 269: 867–872.

Řeřicha M. et al. (2018): Ontogeny of protein concentration, haemocyte concentration and antimicrobial activity against *Escherichia coli* in haemolymph of the invasive harlequin ladybird *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Physiological Entomology* 43: 51-59.

Strand MR (2008): Insect Hemocytes and Their Role in Immunity. *Insect Immunol.* 32: 25–47.

Předběžný termín obhajoby

2019/20 LS – FŽP

Vedoucí práce

Ing. Michal Knapp, Ph.D.

Garantující pracoviště

Katedra ekologie

Konzultant

Ing. Michal Řeřicha

Elektronicky schváleno dne 27. 11. 2018

doc. Ing. Jiří Vojar, Ph.D.

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 28. 11. 2018

prof. RNDr. Vladimír Bejček, CSc.

Děkan

V Praze dne 29. 03. 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma: Vliv potravy během larválního vývoje a páření během dospělosti na imunitní systém: případová studie na slunéčkách vypracoval samostatně a citoval jsem všechny informační zdroje, které jsem v práci použil a které jsem rovněž uvedl na konci práce v seznamu použitých informačních zdrojů.

Jsem si vědom, že na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů, ve znění pozdějších předpisů, především ustanovení § 35 odst. 3 tohoto zákona, tj. o užití tohoto díla.

Jsem si vědom, že odevzdáním bakalářské práce souhlasím s jejím zveřejněním podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů, ve znění pozdějších předpisů, a to i bez ohledu na výsledek její obhajoby. Svým podpisem rovněž prohlašuji, že elektronická verze práce je totožná s verzí tištěnou a že s údaji uvedenými v práci bylo nakládáno v souvislosti s GDPR.

V Praze dne 29.3.2020

.....

Poděkování

Chtěl bych moc poděkovat své rodině a kamarádům za podporu v průběhu celého mého studia. Velké díky patří jmenovitě Ondřeji Táborskému za podporu v těžkých chvílích a také Petře Dandové za to, že mi byla super kamarádkou, na kterou jsem se vždy mohl se vším obrátit. Dále bych chtěl poděkovat mému konzultantovi Ing. Michalovi Řeřichovi za jeho kamarádský přístup a odbornou pomoc s experimentální částí bakalářské práce. Nakonec bych chtěl moc poděkovat mému školiteli Ing. Michalovi Knappovi, Ph.D. za jeho pozitivní a vstřícný přístup.

V Praze dne 29.3.2020

.....

Abstrakt

Imunitní systém představuje základ pro přežití všech živočichů na Zemi, může být ovlivňován faktory vnějšího i vnitřního původu. Mezi významné vnitřní faktory patří vývoj jedince (ontogeneze) a reprodukční úsilí jedince. V mojí bakalářské práci jsem zkoumal vliv potravy během larválního vývoje (ve třetím a čtvrtém instaru) invazního slunéčka východního (*Harmonia axyridis*) na jeho imunitní systém v dospělosti. Zkoumán byl také vliv reprodukčního úsilí na imunitní systém dospělých jedinců a vliv stárnutí na imunitní systém jedinců těchto slunéček.

V první fázi experimentu jsem zkoumal vliv příjmu potravy během larválního vývoje na imunitní systém dospělců. Larvy, které se nacházely ve třetím instaru, byly postupně rozděleny na dvě skupiny - první část larev přijímala potravu v podobě vajíček zavíječe moučného (*Ephestia kuehniella*) každý den (potrava ad libitum) a druhá polovina byla krmena každý druhý až třetí den (nastaven režim hladovění). Následující den, po vylíhnutí dospělých jedinců byly odebrány vzorky hemolymfy a zjištěna koncentrace imunitních buněk (hemocytů) pod světelným mikroskopem pomocí Bürkerovy komůrky. Koncentrace hemocytů se mezi krmenými a hladovějícími jedinci lišila v průměru pouze o 400 hemocytů na 1 μ l čisté hemolymfy a nebyl tak prokázán vliv hladovění během larválního vývoje na buněčnou imunitu čerstvě vylíhlých dospělců.

Ve druhé fázi experimentu byl zkoumán vliv ontogeneze a stárnutí na buněčný imunitní systém dospělých slunéček. Jedincům *Harmonia axyridis* byl postupně odebírán vzorek hemolymfy ve stáří 24 hodin, 30 dní a 90 dní. V těchto časových intervalech byla zjištěna koncentrace hemocytů dle stejné metodiky jako v první části. Byl prokázán vliv ontogeneze a stárnutí na imunitní systém. Průměrná koncentrace hemocytů byla u 24 hodin starých jedinců cca 9200 hemocytů v 1 μ l čisté hemolymfy, u 30 dní starých 42000 na 1 μ l čisté hemolymfy a u 90 dní starých dospělců byla koncentrace 25000 v 1 μ l čisté hemolymfy. Zajímavé je, že oproti očekáváním, páření během dospělosti výrazně neovlivnilo koncentraci hemocytů v hemolymfě.

Vypadá to, že imunitní systém je velmi úzce spjat s vývojem jedince a tato data doplňují a zároveň také potvrzují již dříve zkoumaný trend vývoje imunitního systému slunéček. Vliv larválního hladovění na imunitní systém dospělců nebyl prokázán, což lze přikládat pravděpodobně působením fyziologických změn prodělaných během metamorfózy či obecně nízké investici do imunitního systému během larválního vývoje slunéček.

Klíčová slova: Imunitní systém, ontogeneze, slunéčko východní, hemocyty, hemolymfa, potrava

Abstract

The immune system, which is the basic tool for survival of all the animals living on the earth, can be to some extent affected by factors of external and internal origin. Important internal factors include the development of the individual (ontogenesis) and the reproductive efforts of the individual. In my bachelor thesis, I examined the effect of food intake during the larval development (in the third and fourth instar) of the invasive harlequin (*Harmonia axyridis*) on its immune system in adulthood. The influence of reproductive efforts on the immune system of adult individuals of this kind of harlequin has been examined just as well as the effects of ageing on individuals' immune systems.

In the first phase of the experiment, I examined the effects of food intake during the larval instar on the immune system of freshly hatched adults. The larvae, which were in the third and fourth instar, were gradually taken and divided into two halves – one half of the larvae received food in the form of flour swirl eggs (*Ephestia kuehniella*) every day (food ad libitum) and the other half was fed every second or third day (set a certain starvation mode). The following day, after hatching adult individuals, hemolymph samples were taken and concentration of immune cells (hemocytes) was detected under a light microscope using the Bürker chamber. The concentration of hemocytes differed between fed and starving individuals (on average by 400 hemocytes per 1 μ l of pure hemolymph), thus not proving the effects of starvation during larval development on the cellular immunity of freshly hatched adults.

In the second phase of the experiment, the effect of ontogenesis and ageing on the cellular immune system of adult harlequin was examined. Individuals (*Harmonia axyridis*) were gradually taken a sample of hemolymph at the age of 24 hours, 30 days and 90 days. At these time intervals, the concentration of hemocytes was observed, using the same methodology as in the first phase. The effects of ontogenesis and ageing on the immune system have been demonstrated. The mean hemocyte concentration in 24-hour-old individuals was approximately 9200 hemocytes in 1 μ l of pure hemolymph; for 30-day-old it was 42 000 hemocytes per 1 μ l of pure hemolymph and in 90-day-old adults, the concentration was 25 000 hemocytes in 1 μ l of pure hemolymph.

Note, that nevertheless the expectations, mating during adulthood did not significantly affect the cellular immune system. The immune system appears to be very closely related to the development of the individual and complements this data, while also confirming the previously studied trend of immune system development in instar on the immune system of adults has not been demonstrated, which can probably be attributed to the action physiological changes during metamorphosis.

Keywords: immune system, ontogenesis, *Harmonia axyridis*, hemocytes, hemolymph

Cíle práce

Základním cílem práce je přispět novými poznatky k výzkumu imunitního systému hmyzu a faktorům, které systém ovlivňují.

Dílčím cílem mojí bakalářské práce je teoretický náhled do imunitního systému bezobratlých živočichů, dále jsou zde vysvětleny faktory, které mohou imunitní systém bezobratlých ovlivnit a porovnání imunitního systému bezobratlých s obratlovčími. Poznatky k imunitnímu systému bezobratlých živočichů byly zjišťovány z již provedených studií a experimentů (především z článků databáze Web of Science).

Modelovým organismem je slunéčko východní (*Harmonia axyridis*). Moje bakalářská práce totiž klade důraz vedle řešeršní části také na vlastní experiment. V experimentální části (další dílčí cíl) bakalářské práce je cílem ověřit, že příjem potravy během larválního stádia dokáže opravdu ovlivnit funkci imunitního systému dospělých jedinců. V experimentu jsme také testovali vliv reprodukčního úsilí na imunitní systém. Výsledky praktické části jsou zároveň zpětně konfrontovány s teoretickou částí práce.

Obsah

1	ÚVOD	12
1.1	DŮLEŽITOST IMUNITNÍHO SYSTÉMU PRO HMYZ	12
1.2	ZÁKLADNÍ PŘEHLED IMUNITNÍHO SYSTÉMU HMYZU A POROVNÁNÍ S IMUNITNÍM SYSTÉMEM OBRATLOVCŮ	13
1.3	BUNĚČNÝ IMUNITNÍ SYSTÉM HMYZU, JEHO PODOBNOSTI A ODLIŠNOSTI OD OBRATLOVCŮ	17
1.4	HUMORÁLNÍ IMUNITNÍ SYSTÉM HMYZU, JEHO PODOBNOSTI A ODLIŠNOSTI OD OBRATLOVCŮ	18
1.5	PŘEHLED IMUNITNÍCH REAKCÍ HMYZU	19
1.5.1	BUNĚČNÉ REAKCE	19
1.5.1.1	FAGOCYTÓZA	20
1.5.1.2	NODULACE21	
1.5.1.3	ENKAPSULACE	21
1.5.2	IMUNITNÍ REAKCE NA POMEZÍ BUNĚČNÉ A HUMORÁLNÍ IMUNITY	21
1.5.2.1	KOAGULAČNÍ KASKÁDA	21
1.5.2.2	FENOLOXIDÁZOVÁ KASKÁDA	22
1.6	FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ IMUNITNÍ SYSTÉM HMYZU	22
1.6.1	BIOTICKÉ FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ IMUNITNÍ SYSTÉM HMYZU	23
1.6.1.1	POTRAVA	23
1.6.1.2	POPULAČNÍ HUSTOTA JEDINCŮ	24
1.6.1.3	TLAK PATOGENŮ NA HOSTITELE	24
1.6.2	ABIOTICKÉ FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ IMUNITNÍ SYSTÉM HMYZU	25
1.6.2.1	TEPLOTA	25
1.6.2.2	ŽIVOTNÍ PROSTŘEDÍ	26
1.7	PREIMAGINÁLNÍ VÝVOJ JAKO PREDIKTOR K IMUNITNÍMU SYSTÉMU DospělCŮ HMYZU	26
1.8	VLIV POTRAVY BĚHEM PREIMAGINÁLNÍHO VÝVOJE NA IMUNITNÍ SYSTÉM DospělCŮ HMYZU	27
1.9	SYSTÉM TRADE OFF MEZI REPRODUKČNÍ SCHOPNOSTÍ A IMUNITNÍM SYSTÉMEM (BATEMANŮV PRINCIP)	28
1.10	ZMĚNA INVESTICE DO IMUNITNÍHO SYSTÉMU BĚHEM STÁRNUTÍ DospělCŮ	29
2	METODIKA	31
2.1	ZÁKLADNÍ INFORMACE O STUDOVANÉM DRUHU HARMONIA AXYRIDIS	31
2.2	POPIS EXPERIMENTU	32
2.3	ODBĚR HEMOLYMFY A POČÍTÁNÍ HEMOCYTŮ	33
2.4	ANALÝZA DAT	35
3	VÝSLEDKY	36
4	DISKUZE	39
5	ZÁVĚR	42
6	PŘEHLED LITERATURY A POUŽITÝCH ZDROJŮ	43
7	PŘÍLOHY	47

1 ÚVOD

1.1 Důležitost imunitního systému pro hmyz

Imunitní systém je jedním z nejdůležitějších a nejučinnějších obranných mechanismů pro přežití organismů. Ve starých dobách si ho lidé představovali jako neviditelný štít, který se neustále vyvíjel a měl za úkol chránit jeden biologický druh před jiným druhem. Chránil tedy samotné jedince a také jejich chemickou jedinečnost. Jako příklad lze uvést bakterie nebo plísňe, které v přítomnosti jiných bakterií vypouštějí do svého okolí inhibiční látky (např. antibiotika) a tím se chrání. Mezi nejstarší imunitní reakce patří fagocytóza, kterou využívaly především zmiňované bakterie (původně jako způsob přijímání potravy). V současnosti je fagocytóza chápána jako jev, při kterém dokáže buňka pohlcovat částice, které jsou pro buňku cizí. Zároveň patří k předním reakcím imunitního systému bezobratlých živočichů (Ferenčík et al. 2005).

Imunitní systém hmyzu prošel dlouhým fylogenetickým vývojem a dnes se jedná o poměrně složitý funkční systém. Základní úloha imunitního systému bezobratlých i obratlovců zůstává stejná, chránit jedince před patogeny, negativními vlivy a zajistit funkční ochranu, která povede k delšímu životu. Mezi další důležité úlohy patří odstraňování vlastních buněk, které už pro tělo nemají význam (především poškozené a zničené buňky). Imunitní systém bezobratlých je vybaven speciálními receptory, které rozpoznají cizorodé struktury od vlastních, aby tak nedocházelo k selhání celé imunity. Systém je také důležitý z hlediska prevence. Za pomoci fagocytózy jsou schopny buňky imunitního systému cizorodou strukturu zcela pohltit a zamezit tak dalšímu šíření (Ferenčík et al. 2005).

S pochopením principů fungování imunitního systému lze zlepšit například chov bezobratlých živočichů, kteří se využívají v různých odvětvích. Například v potravinářství (krevety) nebo také v lékařství (pijavka lékařská). V textilním průmyslu lze od bezobratlých využívat různé přírodní materiály (např. hedvábí od bource morušového; Brivio et al. 2005; Hyršl, 2018b). Výzkum principů imunitního systému bezobratlých bude stále velmi důležitý, může dojít například k významnému zlepšení kontroly škůdců zemědělských plodin a lesů, což by významně přispělo ke zlepšení světové biodiverzity (Brivio et al. 2005; Hyršl, 2018b)

1.2 Základní přehled imunitního systému hmyzu a porovnání s imunitním systémem obratlovců

V recentních studiích jsou vysvětlovány funkce imunitního systému, například rozpoznání škodlivých látek od látek neškodlivých, dále také ochrana před patogeny (ty mohou být vnějšího nebo vnitřního původu; Hořejší & Bartůňková, 2005).

Pod pojmem patogen si lze představit nějaký biologický faktor, který může způsobit onemocnění hostitele nebo ho může nějakým způsobem ohrozit. Tyto funkce ochrany organismů se projevují jako obranyschopnost, autotolerance a imunitní dohled (Hořejší & Bartůňková, 2005).

Obranyschopnost je rozpoznání vnějších škodlivin a ochrana před patogenními mikroorganismy. Autotolerance se především zaměřuje na rozpoznání vlastních tkání a na jejich toleranci. Imunitní dohled dohlíží a chrání organismus před vnitřními škodlivinami a odstraňuje staré, narušené nebo zmutované buňky. U živočichů také rozpoznáváme různé druhy imunitních mechanismů, které se dělí především do dvou kategorií: nespecifické (vrozené) a specifické (adaptivní) imunitní systémy (Hořejší & Bartůňková, 2005).

Nespecifické nebo také vrozené imunitní mechanismy jsou mechanismy, které jsou evolučně starší. Jsou tvořeny především buňkami a molekulami, které jsou přítomné v organismu již před reakcí, proto jsou účinné vůči škodlivinám tak, že reagují např. na strukturu, které se podobá struktuře těchto škodlivých patogenů (Hořejší & Bartůňková, 2005).

Specifické nebo také adaptivní imunitní mechanismy jsou evolučně mladší. Tyto mechanismy se od těch vrozených liší tak, že reagují na cizorodé částice pomocí speciálních molekul. Do specifických reakcí patří například protilátky a specifické receptory. Aktivují se ihned, když přijdou do kontaktu s cizorodou částicí (Hořejší & Bartůňková, 2005).

Obecně patří bezobratlí živočichové mezi nejpočetnější organismy na planetě Zemi a jsou zajímavý tím, že disponují pouze specifickou imunitou. V minulosti nebyla výzkumu imunitního systému hmyzu věnována příliš pozornost (Brivio et al. 2005; Hyršl, 2018b).

Od přelomu tisíciletí nastal výrazný progres ve vědeckém bádání o tomto systému. Hmyz je jednou z nejpočetnějších skupin na Zemi a někteří modeloví zástupci jsou pro výzkum velmi dobře dostupní. Konkrétně se jedná o bource morušového (*Bombix mori*), octomilku obecnou (*Drosophilla melanogaster*) nebo také o švába amerického (*Periplaneta americana*; Brivio et al. 2005; Hyršl, 2018a).

Za zmínku také stojí to, že výzkumy na octomilce (*Drosophilla melanogaster*) velmi rozšířily znalosti o vrozené imunitě. Při těchto výzkumech byly porovnány genomy člověka a zmíněné octomilky. Bylo dokázáno, že 75% genů identifikovatelných pro lidské geny, které kódují stavební prvky imunitního systému, jsou u octomilky stejné, a proto se octomilky začaly používat často v lékařství při selekci léčiv (Brivio et al. 2005; Lemaitre & Hoffmann, 2007).

Hmyz je skupina s otevřenou cévní soustavou. Otevřenou cévní soustavu lze charakterizovat jako cévní soustavu, kde tělní tekutinu zastupuje hemolymfa. Hemolymfa je pro hmyz opravdu význačná v oblasti imunity. Je vedena drobnými cévami ze srdce do těla, kde se rozlévá do orgánů. Poté dochází k vstřebání látek z hemolymfy, ovšem některé látky jsou do hemolymfy také vylučovány. Tento děj prakticky probíhá pomocí difuze, probíhá tedy mezi tkáňovým mokem, buňkami a hemolymfou (Kodrík, 2004). Hemolymfa je tělní tekutina, která je někdy bezbarvá, ovšem často může být zbarvena do žluta. Vzácněji může být hemolymfa zbarvena až do červena z důvodu přítomnosti hemoglobinu. Hemolymfa zajišťuje u hmyzu hned několik důležitých funkcí. Například transportuje živiny po těle organismu hmyzu a transportuje i hormony. U některých druhů hmyzu, které disponují měkkým povrchem, se hemolymfa podílí i na tvarování těla. Změnou tlaku se také hemolymfa podílí na rozpínání křídel (mechanická funkce), při mechanickém zranění nebo poškození se podílí na vzniku zátky, která je tvořena melaninem, a jsou na ni postupně nabalovány krevní buňky, kterou ránu postupně ucpávají (zástava krvácení). Dále se hemolymfa podílí na obranných funkcích, rezervuje vodu pro organismus a zajišťuje termoregulaci. Hemolymfa také často obsahuje „antifeedanty“, které odpuzují potencionálního predátora (Kerkut & Gilbert, 1985; Kodrík, 2004).

Bariéry před vstupem patogenů do těla hostitele rozlišujeme celkem dvě. Dělí se na bariéry vnější a vnitřní. Vnější bariéra zamezuje vstupu patogenů do organismu a je tedy v přímém kontaktu s vnějším prostředím. U těla bezobratlých tvoří vnější

bariéru kutikula, která je velmi pevná a tvoří „pokožku“ hmyzu. U obratlovců se jedná o kůži a sliznice (Toman, 2009).

Hlavním principem fungování vnějších bariér je, že dojde k vyhodnocení patogenu na receptorech, které ho vyhodnotí na bázi chemických vlastností, nebo na základě fyzikálních vlastností povrchu. U hmyzu tomu dopomáhají látky, kterou jsou povahy bílkovinné a nazývají se odborným názvem lektiny. Ty fungují tak, že rozeznají glycidy, což jsou látky, které jsou vždy přítomny v buněčné stěně bakterií. Pokud dojde k prolomení této bariéry, nastupuje na scénu specifická nebo nespecifická imunitní reakce. Tyto reakce se řadí mezi vnitřní bariéry (Wigglesworth, 1972; Kodrík, 2004)

Nespecifická imunita je charakterizována tak, že je vrozená a je tedy zakódovaná v DNA. Reakce funguje spontánně bez imunologické paměti. Znamená to tedy, že reakce se stále opakuje, průběh je vždy naprosto totožný, jelikož je zde absence imunologické paměti. Jak již bylo dříve zmíněno, nespecifickou imunitu tvoří především imunitní buňky a humorální komponenty. Imunitní buňky se u bezobratlých nazývají hemocyty a dělí se na pět až šest typů, ale dělení těchto typů není zatím ve vědecké literatuře sjednocené. U obratlovců se imunitní buňky nazývají bílé krvinky (leukocyty), které se také dělí na několik typů. Leukocyty lze charakterizovat jako bílé kulovité útvary a dělí se na agranulocyty a granulocyty. Dalším komponentem, který se podílí na imunitním systému obratlovců, jsou krevní destičky (Wigglesworth, 1972; Kodrík, 2004; Toman, 2009).

Krevní destičky nemají jádro a žijí maximálně několik dnů, u obratlovců pomáhají a urychlují srážení krve při poranění, princip je jednoduchý, jedná se o nahromadění velkého množství těchto krevních destiček, které vytvoří sraženinu a zalepí místo, odkud dochází k úniku tělních tekutin, konkrétně krve. Obdobný jev se také vyskytuje u bezobratlých živočichů a nazývá se koagulace (Toman, 2009). Koagulace nastává prakticky ihned po poranění. U bezobratlých se koagulaci účastní diferencované hemocyty z tzv. prohemocytů, na rozdíl od obratlovců, kde se koagulaci účastní krevní destičky. Poté dochází k migraci hemocytů do místa poranění, kde se hemocyty seskupí a zalepí vzniklou ránu. Vytvoří se zátka, která brání zbytečnému úniku dalších tělních tekutin z těla (Turner, 1994; Nation, 2002).

Nespecifickou reakcí je konkrétně fagocytóza, která je definována jako imunitní reakce, při které dochází k postupnému pohlcování cizorodého organismu nebo-li patogenů. Princip fagocytózy se u obratlovců a bezobratlých moc neliší, rozdílem jsou však buňky, které u obou skupin organismů fagocytózu aktivují (Turner, 1994; Nation, 2002).

Specifická imunitní reakce (absentována u bezobratlých) je zajištěna u obratlovců pomocí lymfocytů a natural killers (NK) buněk. Lymfocyty jsou děleny na dva druhy, Lymfocyty B a T. Lymfocyty B, které se ještě nesetkaly s určitým patogenem jsou vybaveny specifickými receptory, které patogen později umí velmi dobře rozeznat. Lymfocyty T se specializují na rozpoznávání antigenů na povrchu patogenů. Můžeme je také nazvat paměťovými buňkami (Toman, 2009). NK buňky jsou imunitní buňky, které se nazývají přírodními zabíječi a specializují se především na obranu před viry nebo proti potenciálním nádorovým buňkám (Hořejší & Bartůňková, 2005).

Při rozpoznání patogenu a vyhodnocení, že se jedná o hrozbu organismu, se začnou lymfocyty postupně množit a přesouvat tam, kam je potřeba a kde hrozí potenciální hrozba (Jelínek & Koudela, 2003). U obratlovců existují specifické orgány, které obsahují velké množství také lymfocytů (někdy také dalších imunitních buněk), které tvoří pro tyto buňky vhodné prostředí. Jmenovitě jde o brzlík (thymus), kostní dřeň, slezina a lymfatické uzliny, kde se tyto buňky opravdu v hojném množství vyskytují a také zde vznikají (Hořejší & Bartůňková, 2005; Oku et al. 2019).

Velmi důležitým rozdílem mezi imunitním systémem obratlovců a bezobratlých je také fenomén sociální imunity. Sociální imunita zajišťuje jedincům spoustu výhod. Mezi hlavní výhody patří především lehčí shánění potravy, lepší obrana před predátory nebo také často dochází k redukci výskytu nemocí a patogenů. Sociální imunita se ovšem nevyskytuje u všech skupin bezobratlých, ale pouze u vybraných skupin. Typickým příkladem hmyzu se sociální imunitou jsou například včely nebo mravenci. Sociální imunita je jakousi kompenzací, jelikož bezobratlí se sociální imunitou mají o mnoho méně imunitních genů než jiné skupiny (například octomilky nebo komáři; Cremer & Sixt, 2009; Hyršl, 2018b).

1.3 Buněčný imunitní systém hmyzu, jeho podobnosti a odlišnosti od obratlovců

Buněčná imunita hmyzu je zprostředkována pomocí imunitních buněk, které nazýváme hemocyty. Volně se vznášejí v hemolymfě nebo jsou uloženy v tukovém tělese (Turner et al. 1994). Hemocyty jsou diferenciovány ze středního zárodečného listu (mezodermy). Často vznikají dělením ve specifických orgánech, které bývají v oblasti srdce. Tyto orgány však nejsou přítomny u všech druhů bezobratlých, ze studií bylo dokázáno, že u některých druhů ploštic tyto orgány zcela chybí (Wigglesworth, 1972; Kodrík, 2004). Počet hemocytů u bezobratlých kolísá. Závisí tedy především na druhu, na jeho velikosti a vývojové fázi života, ve kterém se jedinec momentálně nachází (Turner et al. 1994; Nation, 2002).

Rozdělení hemocytů bylo v minulosti v literatuře velmi komplikované z důvodu velké rozmanitosti morfologie těchto buněk (Turner et al. 1994). Nakonec se klasifikace ustálila na pět až šest druhů. Mezi tyto druhy patří: prohemocyt, plazmatocyt, granulocyt, koagulocyt, oenocytoid, adipohemocyt a spherulocyt (Gupta, 2002). Prohemocyt lze charakterizovat jako kulovitý útvar velmi malých rozměrů. Rozměry se těchto imunitních buněk pohybují v řádu pár mikrometrů, většinou 6-9 μm . Jsou velmi podstatné z důvodu, že z nich ve specifických orgánech, které se vyskytují často v oblasti velké hřbetní cévy, vznikají ostatní druhy hemocytů (Turner et al., 1994). Plazmatocyt je druhem hemocytů, který je v hemolymfě hojně zastoupen, většinou z 85 % a bývá někdy rozdělen do několika poddruhů (značí se P1 – P4 a liší se velikostí a tvarem). Jedná se především o buňky kulovitého tvaru, výjimkou jsou tzv. P4 plazmatocyty, které vykazují vřetenovitý tvar (Turner et al., 1994). Granulocyt se liší od ostatních typů hemocytů svou velikostí, je poměrně velký. Velikost se pohybuje většinou v řádu pár desítek mikrometrů, často 10-30 μm (Turner et al., 1994). Oenocyt je imunitní buňkou velmi podobnou granulocytům, ovšem je často o několik mikrometrů ještě větší (Turner et al. 1994). Koagulocyt je velmi nestabilní imunitní buňkou, která vzniká při koagulační kaskádě. Při pozorování si u koagulocytu lze všimnout pouze velmi malého jádra, které je kulatého tvaru (Turner et al. 1994; Nation, 2002).

Buňky imunitního systému obratlovců se nazývají leukocyty nebo-li bílé krvinky. Bílých krvinek lze rozdělit na několik druhů, ovšem všechny druhy pocházejí z kmenových buněk, jež jsou v malém počtu přítomny v kostní dřeni po celý život jedince. Z kmenových buněk vznikají hlavní dvě linie-lymfoidní a myeloidní. Zástupci

myeloidní linie jsou monocyty a granulocyty, jsou hlavními komponenty nespecifické imunity. U lymfoidní linie se jmenovitě jedná o lymfocyty typu B, T a NK lymfocyty (Hořejší & Bartůňková, 2005).

Lze říci, že princip buněčné imunity je u obratlovců a bezobratlých živočichů velmi podobný. Buněčnou imunitu zajišťují u obou skupin živočichů imunitní buňky, které se ovšem nazývají jinak. Imunitní buňky jsou často shromažďovány ve specifických orgánech, kde dochází k dozrávání. U obratlovců jsou shromažďovány například v kostní dřeni nebo brzlíku. U hmyzu jsou shromažďovány v oblasti horní hřbetní cévy a také v tukovém tělese. V malém množství se mohou vyskytovat také v hemolymfě (Turner et al. 1994).

Mezi hlavní reakce buněčné imunity všech organismů patří fagocytóza, enkapsulace a nodulace (podrobněji jsou tyto reakce popsány níže v textu). Ve všech případech se jedná o postupné pohlcování patogenů pomocí imunitních buněk nebo dochází k postupnému obklopování imunitními buňkami. Záměr je jasný, cizorodou strukturu zničit a zamezit tak hrozbám, které by mohly vést ke kolapsu organismu (Hořejší & Bartůňková, 2005).

1.4 Humorální imunitní systém hmyzu, jeho podobnosti a odlišnosti od obratlovců

Humorální imunitní systém hmyzu je založen na látkách, které jsou zastoupeny v hemolymfě a s tím spojených nebuněčných reakcích. Zmiňované látky jsou často produkovány pomocí tukového tělesa nebo pomocí hemocytů (Kodrík, 2004). Nelze proto přímo vytvářet ostrou hranici mezi buněčným a humorálním imunitním systémem (Kerkut & Gilbert, 1985; Kodrík, 2004).

U bezobratlých živočichů tvoří humorální imunitní systém konkrétně dvě proteolitické kaskády: koagulační a fenoloxidázová kaskáda. Nedílnou součástí humorální imunity jsou také lysosomy, lektiny, antibakteriální a regulační peptidy (Kurtz & Armitage, 2006; Hyršl, 2018b). Lysosom je podstatným komponentem humorálního imunitního systému. Vyskytuje se u bezobratlých i u obratlovců. Hlavní úlohou lysozymu je při rozeznání cizorodého organismu postupné narušování jeho buněčné stěny a zamezení dalšího šíření cizorodého organismu (Kurtz & Armitage, 2006; Hyršl, 2018b). Lektiny jsou skupinou látek patřící do bílkovin, které fungují tak, že pomocí tzv. glycidů jsou schopny rozeznávat cizí struktury. Vznikají v tukovém

tělese po poranění a podílí se tak na destrukci patogenů. Vyskytují se také u obratlovců (Kurtz & Armitage, 2006; Hyršl, 2018b). Dalším zajímavým komponentem humorální imunity bezobratlých a obratlovců jsou aglutininy. Opět se jedná o skupinu látek bílkovinného původu. U těchto aglutininů byla zaznamenána různá imunitní intenzita, která závisela na výskytu patogenů. Nevyskytují se pouze v těle bezobratlých živočichů, ale vyskytují se často na povrchu těla nebo také v tělních tekutinách (Hyršl, 2018b). U obratlovců tvoří humorální imunitní systém komplementový systém. Pod pojmem komplement si lze představit soubor proteinů a glykoproteinů. Komplementový systém je spuštěn pomocí komplementových kaskád, které tvoří ochranu před cizorodými organismy. Setkáme se zde také s tzv. opsonizací. Opsonizaci lze definovat jako děj, který předchází fagocytóze, při kterém dochází k navázání komplementu na cizorodé organismy. Tento jev způsobuje lehčí pohlcování a ničení buněk a cizorodých organismů. Komplementový systém je velmi důležitý také při eliminaci nádorových buněk a při tvorbě zánětu. Zánět je odpověď organismu na poškozené tkáně, nejprve probíhá lokálně a poté pomocí systémové odpovědi (především jde o horečku apod.; Šterzl, 2005).

1.5 Přehled imunitních reakcí hmyzu

U skupiny hmyzu se lze setkat s několika imunitními reakcemi, které brání tělo před napadením cizorodých organismů. Lze je rozdělit do několika kategorií: vnější bariéry, vnitřní buněčné a humorální komponenty. Buněčné a humorální komponenty reprezentují různé typy imunitních reakcí, ovšem většinou spolu velmi dobře spolupracují. Zda-li se jedná o buněčnou nebo humorální odpověď záleží na tom, která složka převažuje na konci imunitní reakce (Turner, 1994; Nation, 2002).

1.5.1 Buněčné reakce

Vůbec nejvýznamnější buněčnou reakcí je fagocytóza, která je přítomna u všech bezobratlých organismů. Další reakce jsou: enkapsulace, hojení ran, nodulace a koagulace (Turner, 1994).

1.5.1.1 Fagocytóza

Fagocytóza byla původně reakcí pro přijímání potravy, ovšem postupným vývojem byla nahrazena dokonalejším trávením, a tak již byla pro přijímání potravy zbytečná. Fagocytóza se stala základní buněčnou odpovědí eukaryotních organismů. U bezobratlých živočichů se jedná o prvotní reakci, kdy dochází ke střetu s patogenem. Fagocytóza je proces, který probíhá v několika fázích (Turner, 1994).

První fází fagocytózy je tzv. chemotaxe. Chemotaxe se dá popsat jako rychlý jednosměrný pohyb fagocytů směrem k cizorodé látce, aby jí co nejdříve pohltily. Rozpoznání cizorodých látek je zde klíčový faktor a bez něj by fagocytóza nemohla fungovat (Gupta, 2002).

Receptory

Povrchové receptory jsou velmi důležitým komponentem fagocytózy z důvodu shlukování buněk a přijímání potravy. Tyto povrchové receptory dohlíží nad pohybem buněk. U bezobratlých živočichů byly na povrchu imunitních buněk nalezeny různé druhy receptorů, které umí rozeznat lektiny. Receptory u obratlovců mají stejnou funkci a pracují velmi podobně (Gupta, 1997).

Cytoskelet

Cytoskelet je dalším důležitým komponentem fagocytózy. Především ohraničuje plazmatickou membránu a udává tak tvar imunitních buněk. Dále také pomáhá s upevněním receptorů a transportuje mediátorovu ribonukleovou kyselinu (mRNA). Cytoskelet je tvořen několika vlákny bílkovinné povahy (například bílkovina aktin, mikrotubuly apod.; Gupta & Campenot, 1996). Fagocytóza je tedy obecně odpověď na reakci imunitních buněk (Gupta, 1997).

Ve druhé fázi fagocytózy dochází ke střetu imunitních buněk s cizorodým organismem a také dochází k jejich následnému spojení. K rozpoznání cizorodého organismu může pomoci také povrchový náboj, ale standartně dochází k rozpoznání cizorodých látek pomocí receptorů (Turner, 1994).

Pokud tedy dojde k vyhodnocení částice jako cizorodé, následuje poslední fáze fagocytózy. Zde dochází k postupnému pohlcování cizorodé látky fagocylem. Fagocyt začne buňku postupně obklopot a umisťovat ji do fagocytující vakuoly. Zde jsou potom části buněk patogenu tráveny pomocí enzymů, kyselin apod. (Turner, 1994).

1.5.1.2 Nodulace

Nodulace je děj, který se spouští při vniknutí velkého množství cizorodých organismů do těla bezobratlého. Děj spočívá ve vytváření nodulí, což jsou tzv. kapsule nebo přihrádky, které vznikají nahromaděním hemocytů a dochází zde k úplnému obklopení buňky (struktury) cizorodého původu. Hlavním smyslem nodulace spočívá v tom, aby se patogen dále v těle nešířil a nezpůsobil organismu další komplikace (Kurtz & Armitage, 2006; Hyršl, 2018b).

1.5.1.3 Enkapsulace

Princip enkapsulace je děj podobný nodulaci. Opět dochází k obklopení cizorodé buňky nebo struktury, aby se minimalizovalo zatížení organismu. K enkapsulaci dochází pouze tehdy, pokud se jedná o velké množství cizorodých buněk, na které již nestačí samotná nodulace nebo pokud se jedná o jednu cizorodou strukturu velkých rozměrů. Hemocyty v tomto případě nejsou schopny patogen dostatečně pohltit a zlikvidovat. Vzniká zde obal, který se nazývá kapsule. Enkapsulace se dělí na humorální a buněčnou. Pro obě formy je společné to, že je patogen rozeznán a postupně obalen, po určité době dojde k vytvoření kapsule. Buněčná enkapsulace se liší tím, že je kapsule obalena melaninem. V kapsuli je cizorodá buňka naprosto obklopena a působí na ni několik faktorů, které vedou k postupné likvidaci (například reaktivní metabolity kyslíku a dusíku; Kurtz & Armitage, 2006; Hyršl, 2018b).

1.5.2 Imunitní reakce na pomezí buněčné a humorální imunity

1.5.2.1 Koagulační kaskáda

Ke koagulační kaskádě u bezobratlých dochází v případě poranění, aby nedocházelo ke zbytečnému úniku tekutin z těla. Je třeba zmínit, že koagulační kaskáda je na pomezí mezi buněčnou a humorální imunitou, z důvodu průběžného rozpadu imunitní buněk, konkrétně tedy hemocytů a působení humorálních komponentů při reakcích (Stanley-Samuelson & David, 1991; Hyršl, 2018b).

Tím tedy dochází k vytvoření bílkovinné zátky, která poraněné místo ucpe a zamezí úniku tekutin. Obecně koagulační kaskáda dobře spolupracuje s fenoloxidázovou kaskádou a toto propojení je ukázkový příklad toho, jak spolu spolupracuje buněčná a humorální imunita (Stanley-Samuelson & David, 1991; Hyršl, 2018b).

1.5.2.2 Fenoloxidázová kaskáda

Fenoloxidázová kaskáda může být spuštěna stejně jako u koagulační kaskády poraněním nebo střetem s buňkou cizorodého organismu. Důležité je zmínit, že tato reakce se nevyskytuje u všech bezobratlých živočichů, vyskytuje se především u skupiny korýšů, měkkýšů a hmyzu. V minulosti bylo doloženo, že fenoloxidázová kaskáda se nevyskytuje například u skupiny klíšťat. Podstatou této kaskády je aktivování enzymu fenoloxidázy, který katalyzuje a dochází k tvorbě melaninu. Konkrétně je tedy tato reakce spuštěna pomocí složek, které se vyskytují ve stěnách bakterií a dochází k postupné přeměně na fenoloxidázu, která je v aktivní formě (Hyršl, 2018b). Konečný bod reakce tvoří tedy vznik melaninu, který v praxi lze zaznamenat tmavým zbarvením (Turner, 1994; Gupta, 2004).

1.6 Faktory ovlivňující imunitní systém hmyzu

Přežití organismu závisí na mnoha podmínkách. Hmyz je obzvláště úspěšný v adaptaci na environmentální stres, a proto jsou mechanismy stresového vnímání a reakcí důležitými otázkami. Odezvy hmyzu na stres jsou tématy intenzivního studia (Clark & Worland, 2008; Teets et al. 2011). Fyziologické děje, kam spadá i imunita hmyzu, jsou ovlivňovány celou řadou faktorů. Faktory, které mohou imunitní systém ovlivnit negativním i pozitivním směrem, lze rozdělit do několika skupin. Konkrétně je imunitní systém hmyzu ovlivněn faktory biotickými a abiotickými. Do biotických faktorů spadají především potrava a její dostupnost, populační hustota (denzita) a tlak patogenů na hostitele (Kodrík, 2004). Stresorů, které na jedince negativně působí, může být najednou i několik. V tomto případě jde o synapsi několika stresorů zároveň, to je v přírodě velmi obvyklé. Jako další významný faktor lze zařadit vliv okolního životního prostředí (Dinh & Stoks, 2016).

1.6.1 Biotické faktory ovlivňující imunitní systém hmyzu

1.6.1.1 Potrava

Mezi biotické faktory bychom mohli zařadit například dostupnost potravy. Je zřejmé, že kvalitní potrava a její dostatečné množství pozitivně ovlivňuje vývoj jedinců (Kodrík, 2004). U většiny bezobratlých živočichů velikost těla vyplývá často z genetických predispozic v kombinaci s plasticitou plynoucí z kvality výživy. Lze říci, že při přijímání většího množství potravy by mělo být tělo jedince větší. Ovšem existují také některé výjimky, například u některých motýlů vede přijímání menšího množství potravy spíše k prodloužení vývoje než ke zmenšení těla v dospělosti (Kerkut & Gilbert, 1985; Kodrík, 2004).

Jelikož je přísun potravy v přírodě často omezen, stává se, že jedinci jsou vystaveni hladovění, což způsobuje fyziologický stres (Metcalf & Monaghan, 2001). Vznikl také názor, že snížená koncentrace proteinu v hemolymfě je pravděpodobně podstatně ovlivňován hladověním (Handke et al. 2013). Hladovění může také způsobit reakci, která slouží k tomu, aby jedinec minimalizoval rychlost svého metabolismu, a tím investuje energii do imunitního systému, protože potřebuje přežít (Guppy & Kohoutek, 1999; Marshall & McQuaid, 2010; Storey, 2015). Studie, která se vlivem potravy na imunitní systém hmyzu zabývala, proběhla na larvách šidélka páskovaného (*Puella damsel*). Zde byli jedinci v různých larválních instarech vystaveni dennímu přísunu potravy, přísun byl buďto vysoký nebo velmi malý. Předpoklad byl takový, že přísun menšího množství potravy bude mít na jedince negativní vliv. Výsledky byly takové, že larvální jedinci, kteří hladověli, měli opravdu menší velikost těla a menší tukové zásoby než jedinci, kteří přijímali potravu pravidelně (Janssens & Stoks, 2013; Arambourou & Stoks, 2015). Z hlediska vlivu potravy na imunitní systém jedinců bylo v tomto experimentu dokázáno, že vliv potravy má vliv na mortalitu jedinců. Konkrétně jedinci s větším příjmem potravy žili déle, je tedy pravděpodobné, že funkčnost jejich imunitního systému byla lepší než u jedinců hladovějících (Bayoh & Lindsay, 2003; Muturi et al. 2010). Další experiment proběhl v roce 2006 na larvách zavíječe paprikového (*Plodia interpunctella*). Byla zde zkoumána koncentrace hemocytů v hemolymfě. Larvy byly rozděleny do dvou kategorií podle příjmu potravy. První skupina si dopřávala kvalitní potravu s důrazem na dostatek proteinů a lipidů, druhá skupina měla stravu mnohem méně kvalitní. Závěr byl takový, že larvální jedinci, kteří měli kvalitní stravu s důrazem na lipidy, proteiny a mikroživiny,

disponovali lepší funkcí imunitního systému. Koncentrace hemocytů u jedinců s horší kvalitou potravy byla mnohem nižší, přibližně o 46 % (Triggs & Knell, 2012).

1.6.1.2 Populační hustota jedinců

Lze říci, že při vyšší koncentraci jedinců je daleko snazší pro patogen se šířit a jsou zde pro něj lepší podmínky z hlediska rozšíření infekcí (Anderson, 1981). Toto ovšem vyvrací studie z roku 2001 a 2002. V těchto letech proběhl experiment na červu africkém (*Spodoptera exempta*) a kobylce pouštní (*Schistocerca gregaria*). Jedinci těchto druhů se vložili do stísněných prostor s vyšší koncentrací jedinců a do prostor, kde byla koncentrace jedinců nižší. Výsledky byly takové, že jedinci, kteří se vyskytovali ve vyšší populační hustotě prokazovali vyšší fenoloxidázovou aktivitu, trpěli tedy méně houbovými infekcemi a měli zvýšenou činnost imunitního systému. (Wilson & Reeson, 1998).

1.6.1.3 Tlak patogenů na hostitele

Dalším faktorem, který ovlivňuje imunitní systém bezobratlých, je přítomnost patogenů. Výskyt a četnost patogenů jsou velmi často provázané s vnějším prostředím (Lazzaro & Little, 2009). To, jaký účinek bude mít negativní vliv patogenu na konkrétní druh, záleží na kondici a zdatnosti svého potencionálního hostitele. Je zřejmé, že jedinci s lepší zdatností jsou schopni svou energii investovat do imunitního systému a tím lépe odolat potenciálním hrozbám ze strany patogenů. Obecně lze říci, že tyto jedinci jsou schopni odolávat většímu množství různých patogenů. Tolerování patogenu je stav, kdy se patogen vyskytuje v nízké koncentraci a nemůže tak ovlivnit tělo hostitele. Odpor proti patogenům nebo boj s patogeny začne tehdy, pokud je koncentrace patogenu dostačující, aby na tělo hostitele byl schopen vyvinout určitý tlak, kterému musí daný živočich odolávat (Moreno-García et al. 2014).

1.6.2 Abiotické faktory ovlivňující imunitní systém hmyzu

1.6.2.1 Teplota

Je důležité zmínit, že hmyz patří do skupiny živočichů, kde jedinci neumí automaticky kontrolovat a měnit svoji tělesnou teplotu. Znamená to tedy, že teplotu jejich těla ovlivňuje okolí a vnější prostředí. Tento mechanismus má samozřejmě své výhody a nevýhody. Mezi hlavní výhody patří šetření energie, hmyz tedy nemusí ztrácet energii na udržení své tělesné teploty a může ji investovat jinač (Triggs & Knell, 2012). Jako hlavní nevýhodou je fakt, že při extrémně vysokých nebo nízkých teplotách nejsou schopni jedinci zajišťovat své hlavní životní funkce a poté upadají do abiotických stavů. U hmyzu se vyskytují dohromady dva druhy termoregulací teploty. Jedná se o behaviorální a fyziologickou termoregulaci (Kodrík, 2004).

Teplota je jeden z abiotických faktorů životního prostředí, který významně ovlivňuje buněčnou i humorální imunitu hmyzu (Catalán et al. 2012). Vystavováním se extrémním teplotám je v posledních dobách velmi časté z důvodu globálních změn klimatu. Pokud jsou vysoké teploty zkombinované s nedostatkem potravy, důsledky mohou být opravdu fatální. Některé faktory mohou negativně působit na jedince se zpožděním. Znamená to tedy, že účinek určitých stresorů se projeví na organismu až po určité době. Jedna studie se této konkrétní situaci zabývala. Studie probíhala na larvách šidélka páskovaného (*Coenagrion puella*). Jedinci byli chováni v laboratorních podmínkách, byl zde zkoumán vliv extrémních vysokých teplot, hladovění a aplikace insekticidů. Výsledek byl takový, že extrémní teploty snížily imunitní systém těchto jedinců. Teplota měla účinek na imunitní systém až po určité době, účinek náhlého negativního ovlivnění imunitního systému nebyl signifikantní. Byla zde prokazatelně snížena aktivita fenoloxidázy při teplotě 30 °C a také došlo ke snížení rychlosti celkového metabolismu. Larvy byly obecně menšího vzrůstu, měly tedy nižší tělesnou hmotnost a také trpěly větší úmrtností než jedinci, kteří byli vystaveni teplotě 22°C (Dinh & Stoks, 2016).

Opačným extrémem jsou velmi nízké teploty. Na nízkou teplotu často hmyz reaguje snížením rychlosti metabolismu, tento jev bývá velmi často spojován s nedostatkem vody (Danks, 2000). To, jak daný organismus reaguje na změnu teplot se nazývá termínem cross-talk. Cross talk lze definovat jako určitou signální nebo regulační dráhu, která aktivuje v organismu obranné mechanismy na jakýkoliv stres (Dinh & Stoks, 2016).

V přírodě také nastávají situace, kdy se musí imunitní systém hmyzu vypořádat s několika negativními faktory najednou, například s teplotou a dalšími vlivy, které pochází ze životního prostředí. Typickým příkladem je přezimování hmyzu, kdy hmyz musí odolávat nízkým teplotám a zároveň také vysoušení. Hmyz si proto vytvořil mechanismy, které pomáhají negativním vlivům odolávat. První strategie je tzv. chladu tolerantní hmyz, který je schopný udržovat rovnováhu při změnách v koncentraci iontů, které jsou obsaženy v hemolymfě, pokud dojde k poklesu pod hranici 0 °C (Kristiansen & Zachariassen, 2001; Gibbs et al. 2003).

1.6.2.2 Životní prostředí

Od dývných dob se organismy potýkají s útokem parazitů ve volném prostředí a ideální obrana proti nim pochází z energetických zdrojů, které jsou velmi flexibilní a souvisí s pojmem fitness (Feeny, 1976). Vliv životního prostředí na imunitní systém je zřejmý, ovšem vždy se nemusí nutně jednat o vlivy negativní (Feeny, 1976). Podrobnější důsledky, jak může životní prostředí ovlivňovat imunitní systém jsem popsal v předchozí kapitole věnující se vlivu přezimování.

1.7 Preimaginální vývoj jako prediktor k imunitnímu systému dospělců hmyzu

Energetické investice do správně fungujícího imunitního systému organismu jsou velmi nákladné a existují domněnky, že během vývoje jedince jsou tyto energetické zásoby různě přelévány do jiných důležitých funkcí (Schwenke et al. 2016). Typickým příkladem, kdy dochází k důležité změně tkání u jedinců hmyzu, a tím tedy ke změně investice energetických zásob do imunitního systému, je metamorfóza (Nation, 2015). Je třeba říci, že toto jsou zatím pouze domněnky, jelikož vliv vývoje na imunitní systém bezobratlých nebyl do této chvíle tak intenzivně zkoumán, abychom všem mechanismům dostatečně porozuměli (Hyršl, 2018a).

Dalším experimentem preimaginálního vývoje na imunitní systém se zabýval pan Schmidtberg s jeho týmem v roce 2013. Studium se zabývalo porovnáním larev v prvním instaru s dospělými jedinci. Bylo zřejmé, že dospělí jedinci měli vyšší hladinu fenoloxidázové aktivity. Další velmi důležitá studie proběhla na území České republiky v roce 2018, konkrétně na slunéčku východním (*Harmonia axyridis*). Experiment proběhl na půdě České zemědělské univerzity v Praze a tým, který na experimentu pracoval, byl následující: Ing. Michal Knapp, Ph.D., Ing. Michal Řeřicha, Mgr. Pavel Dobeš, Ph.D. a RNDr. Pavel Hyršl, Ph.D. Tato studie se zabývala nejen vlivem ontogeneze na imunitní systém bezobratlých, ale zabývala se také vlivem pohlaví a příjmu potravy na funkci imunitního systému. Podle studie má průběh ontogeneze důležitý vliv na imunitní systém jedince (Řeřicha et al. 2018). Larvy jedinců měly v průběhu ontogeneze stoupající nárůst koncentrace hemocytů. Podobné schéma má vývoj imunitního systému dospělého jedince, ovšem u čerstvě narozené jedince je koncentrace hemocytů nižší než u larev (Řeřicha et al. 2018).

1.8 Vliv potravy během preimaginálního vývoje na imunitní systém dospělců hmyzu

Existují určité podmínky (faktory), které mohou během larválního vývoje do budoucna poznamenat dospělého jedince. Jedna ze studií, která se zabývala tímto tématem, byla provedena na larvách motýlic (*Lestes viridis*). Larvy zde byly rozděleny do dvou skupin – jedna skupina larev dostávala o polovinu méně potravy než skupina druhá. Výsledek ukázal, že larvy, které přijímaly menší množství potravy, vykazují v dospělosti nižší fenoloxidázovou aktivitu a také jejich hemolymfa obsahuje nižší koncentraci hemocytů (Rolff, 2002).

Skutečnou příčinu vlivu příjmu potravy v larválním stádiu na imunitní systém dospělců vědci zatím neznají. Existují teorie, které mohou tuto otázku poodhalit. Následující teorie popisují dva mechanismy, jak by tento jev mohl pravděpodobně fungovat (Fellous & Lazzaro, 2010). První z teorií je vysvětluje následovně: při přijímání potravy dochází ke zvyšování zdrojů energie, které jsou velmi významné při stimulaci imunitního systému, tím pádem obecně dochází ke zlepšení životních podmínek, což vede k lepšímu zdraví (fitness). To je cestou k lépe fungujícímu a silnějšímu imunitnímu systému (Fellous & Lazzaro, 2010).

Druhá teorie je podpořena experimentem, který proběhl na komárech, slunéčkách a také na již dříve zmiňovaných motýlicích (Fellous & Lazzaro, 2010). Všechny tyto studie byly opět zaměřeny na hladovění nebo přísun potravy. Zde se ukázalo, že menší přísun potravy neovlivňuje pouze negativně imunitní systém dospělých jedinců, ale také ovlivňuje velikost jejich těla a procentuální zastoupení tuků. Proto se tento poznatek otestoval dalším experimentem na octomilce (Fellous & Lazzaro, 2010). Došlo k testování, zda imunitní systém dospělců koreluje s jinými ukazateli celkového stavu nebo je imunitní systém dospělců ovlivněna výživou v larválním stádiu. Larvám se podávalo žrádlo, kde byly obsaženy kvasinky, které se považují za jediný přísun bílkovin zmiňovaných octomilek, a ukázalo se, že množství těchto bílkovin opravdu ovlivňuje reprodukci, stárnutí a také imunitní systém dospělců (Rolff et al. 2004; Fellous & Lazzaro, 2010).

1.9 Systém trade off mezi reprodukční schopností a imunitním systémem (Batemanův princip)

Termín trade off je pojmem, který se vyskytuje v evoluční biologii a znamená nutnost volby jedince investovat/uplatnit omezené zdroje jedním či druhým způsobem. Pro reprodukci je velmi důležitý a hraje zde svou významnou roli (Sheldon & Verhulst, 1996).

Je vědecky doloženo, že samci spotřebovávají více energetických zásob z důvodu boje s ostatními samci o samičky. Z tohoto faktu vyplývá, že pokud spousta energie samci investují do boje s konkurencí, méně energie zbývá pro obranyschopnost, tím pádem se dožívají kratšího věku než samice (Adamo et al. 2001). Teorie, která tento princip popisuje, se nazývá Batemanův princip. Jako první experiment provedl právě A. J. Bateman a proběhl na octomilce. Celý experiment spočíval v tom, že byl chován určitý počet jedinců od každého pohlaví. Jedinci se mohli pářit dle libosti. Sledovala se tedy jejich reprodukční úspěšnost. Kromě malých odchylek byla průměrná hodnota úspěšnosti stejná u obou pohlaví. Jinak řečeno, rozdíl mezi nejplodnější a nejméně plodnou samicí nebyl tak velký. Naproti tomu rozdíl mezi nejplodnějším a nejméně plodným samcem byl znatelný (Bateman, 1948). Z principu lze vyvodit, že samice obecně více investují do svého imunitního systému, aby se mohly dožít vyššího věku a mít tedy více potomků, u samců jde spíše o frekvenci páření (Rolff, 2002).

Za zmínku také stojí, že živočichové mají různé životní strategie. Především se rozlišují dvě životní strategie. Jedna z nich se nazývá „capital beeders“ a jedná se o strategii s velmi krátkým životem. Jedinec prakticky nepřijímá potravu a jediným jeho úkolem je rozmnožování. Typickým zástupcem této životní strategie je jepice obecná (*Ephemera vulgata*). S touto souvislostí je známý termín jepičí život. Druhá strategie se nazývá „income beeders“ a na rozdíl od první je život jedince daleko delší. Přijímá tedy potravu a postupně získává energii, kterou investuje do rozmnožování (Houston et al. 2006).

1.10 Změna investice do imunitního systému během stárnutí dospělců

Stárnutí je pojem, který se dá často popsat jako zhoršování fyziologických vlastností s přibývajícím věkem. Obecně je stárnutí organismů a vývoj imunitního systému v dospělosti spojeno s určitými podmínkami. Jedná se především o pohlaví, reprodukční úspěch a hmotnost dospělých jedinců (Nussey, 2013).

Jeden z výzkumů, který se touto problematikou zabýval, pochází z roku 1970 a trval po dobu 35 let. Jako modelový druh zde byl zvolen jezevec evropský (*Meles meles meles*). Studie se zaměřovala na odchyt jedinců, kteří byli minimálně 5 let staří. Chytali se do pastí a byli následně označkováni. Při odchycení bylo vždy zaznamenáno místo odchytu, pohlaví, hmotnost a následně byli jedinci rozřazeni do kategorií podle věku (jednalo se tedy o mladistvé a dospělé). Výsledky této studie byly následující: bylo zjištěno, že se stárnutím je spojené ztrácení tělesné hmotnosti, u samců byl tento pokles daleko strmější než u samic. To, jak budou samci rychle ztrácet svoji tělesnou hmotnost, je podle studie také ovlivněno tím, zda-li byl mladý samec ve společnosti dalších samců. Čím větší tělesnou hmotnost samci měli, tím více se rozmnožovali, ale také více umírali. Z tohoto tvrzení také plyne, že samci, kteří mají větší úpadek tělesné hmotnosti umírají dříve, jelikož musí investovat energii do reprodukčního úsilí (Woodroffe, 1995; Kelly et al. 2018).

Příklad další studie, která se zabírala změnou investice do imunitního systému během stárnutí dospělců, byla provedena na dospělých mravencích (*Acromyrmex octospinosus*). Mravenci byli staří 24 hodin až 71 dní. Prokázalo se, že starší mravenci měli vyšší aktivitu fenoloxidázy, což pravděpodobně znamená, že disponovali lepším imunitním systémem než mravenci mladší (Finkel et al. 2000; Armitage & Boomsma, 2010). Další studium proběhlo na octomilce (*Drosophilla melanogaster*). Byla zde

testována míra enkapsulace u dospělých jedinců. Prokázalo se, že schopnost enkapsulace s přibývajícím věkem klesá, to znamená, že jejich imunitní systém s přibývajícím věkem posupně slábnul (Armitage & Boomsma, 2010).

Další velmi důležitá studie proběhla na území České republiky na sluněčku východním (*Harmonia axyridis*). Experiment proběhl na půdě České zemědělské univerzity v Praze a tým, kterým na mě pracoval byl veden Ing Michalem Řeřichou a Ing. Michalem Knappem, Ph.D. Podle studie má průběh ontogeneze důležitý vliv na imunitní systém jedince (Řeřicha et al. 2018). Larvy jedinců měly v průběhu ontogeneze stoupající nárůst koncentrace hemocytů. Podobné schéma má vývoj imunitního systému dospělého jedince, ovšem u čerstvě narozené jedince je koncentrace hemocytů nižší než u larev (Řeřicha et al. 2018).

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2 METODIKA

2.1 Základní informace o studovaném druhu *Harmonia axyridis*

Slunéčko východní (*Harmonia axyridis*) je invazní, polyfágní brouk a původně pochází z oblastí subtropického až mírného klimatického pásu, konkrétně z východní Asie. Postupem času se začalo záměrně vysazovat na jiných kontinentech, také v Evropě, kvůli své aktivitě v požívání mšic a jiných drobných živočichů. Je to tedy takový malý ochránce před škůdci rostlin. První populace, která byla určena k biologické ochraně rostlin před mšicemi, byla vypuštěna v USA kolem roku 1915 (Nedvěd, 2014). První objevy přítomnosti slunéčka východního na našem území objevil výzkumný tým v roce 2007 v třešňovém sadu v Českém středohoří. Dále toto slunéčko bylo objeveno na určitých místech v Praze, v Brně a ve středních Čechách (Nedvěd et al. 2011).

Původní areál slunéčka je subtropický až mírný zeměpisný pás, to znamená, že se vyskytovalo především v zemích východní Asie, kam patří například Japonsko, Čína, Korea a další země. Geneticky bychom mohli toto slunéčko rozdělit na dva rozdílné geografické populace-západní a východní. Brouci ze západního areálu se vyznačují znakem bez kýlu na krovkách, zatímco východní se vyznačují s kýlem na krovkách (Nedvěd et al. 2011).

Ovšem na tento druh brouka se nedíváme pouze pozitivně, jelikož se v poslední době velmi přemnožil, a to z něj udělalo velmi obtížný hmyz, který často zimuje v domácnostech, občas kouše lidi nebo zalézá do vinné révy a kazí chuť vína. Jelikož je slunéčko velmi odolné vůči patogenům, je pro něj opravdu snadné se dále šířit (Nedvěd, 2014).

Slunéčka při nedostatku potravy jedinci také požívají svá vajíčka, a tím dochází tedy ke kanibalismu. Specifickým jevem u tohoto druhu slunéčka je to, že při kanibalismu nepožírají pouze svá vajíčka a larvy, jako je to u ostatních druhů, ale požívají také vajíčka a larvy jiných druhů slunéček. Toto lze označit za problém, jelikož tento druh postupně vytlačuje další druhy slunéček. Velikost těla tohoto slunéčka je velmi variabilní. Jeho délku měříme v milimetrech, často měří 6 až 9 mm (Lombaert et al. 2011; Nedvěd, 2014; Honěk et al. 2017)

Dospělí jedinci slunéčka východního mohou mít různá zbarvení krovek (mohou se lišit v barvě krovek nebo v typu barevného vzoru). Barva krovek se pohybuje od oranžové do čistě červené, někdy se může objevit i černé zbarvení. Na našem území převažují slunéčka se světlým zbarvením, v celkovém zastoupení cca 87 % (Nedvěd, 2014; Honěk et al. 2017). Výskyt slunéček s černými krovkami je méně častý, a tím také vzácný. U forem oranžového a červeného zbarvení krovek se mohou na povrchu objevovat černé skvrny připomínající zdánlivě tečky v počtu, který se pohybuje od 0 až do 21 (Majerus et al. 2006).

Povědomí o buněčné imunitě tohoto druhu slunéčka je poměrně vzácné, ale v poslední době je intenzivně studována i na našem území (Řeřicha et al. 2018). V porovnání s ostatními druhy slunéček se jeví obsah hemolymfy slunéčka východního velmi účinný proti patogenům (pravděpodobně ovlivněno tím, že dospělci investují obrovské množství energie do jejich funkce imunitního systému; Řeřicha et al. 2018). Účinnost proti patogenům může být také zdůvodněna vyšší koncentrací antibakteriálních peptidů v hemolymfě, dále také harmoninem, jedná se o alkaloid, který je také obsažen v hemolymfě a je pro toto slunéčko specifickým (Beckert et al. 2015).

2.2 Popis experimentu

Celá experimentální část bakalářské práce probíhala v laboratoři D414 v budově Mezifakultního centra environmentálních věd na půdě České zemědělské univerzity v Praze a byla pod odborným vedením Ing. Michala Knappa, Ph.D. a Ing. Michala Řeřichy. Rodičovských párů pro experimentální část práce bylo celkem šest a pocházely z oblasti Konětop a Nučic. Jedinci byli chováni při konstantní teplotě 23 °C a relativní vlhkosti vzduchu cca 50 %. Přístup světla byl nastaven na cca 16 hodin denně (16L:8D), celý experiment takto probíhal ve standardizovaných podmínkách.

Rodičovské páry byly postupně vloženy do Petriho misek, každému páru byl přidělen papír složený do harmoniky a ústřížek papírového kapesníku nasáklý vodou. Papírek do tvaru harmoniky sloužil k umístění potravy a k případnému kladení vajíček. Jako potravu jsme použili vajíčka zavíječe moučného (*Ephestia kuehniella*).

Nakladená vajíčka slunéček byla tedy chována v laboratorních podmínkách, rodičovským párům byla postupně vajíčka odebrána a vložena do nových Petriho

misek, které byly označeny příslušným kódem, aby se poznalo, od kterého z párů pochází. Při vývoji larev do třetího instaru byly rozděleny ve stejném počtu od každého rodičovského páru do dvou kategorií podle toho, zda budou dále vystavováni hladovění nebo budou přijímat potravu každý den. Toto bylo každý den pečlivě kontrolováno. Na konci čtvrtého instaru se jedinci postupně začali chystat na kuklení, stala se z nich tzv. prepupa, to znamená, že se přilepili k podkladu a přestali přijímat potravu. Tyto Petriho misky byly zbaveny potravy, vody a postupně se zapisovalo datum zakuklení jedinců a následně i narození dospělého jedince. Pro pozdější analýzy vlivu potravy na délku vývoje jednotlivých instarů (není součástí této bakalářské práce).

Při vylíhnutí dospělých jedinců bylo určeno jejich pohlaví pomocí stereoskopického mikroskopu, zvážena jejich hmotnost a postupně se vše zapisovalo do připravených záznamových archů. Z každého rodičovského páru byl vybrán stejný počet jedinců a rozdělen do nových Petriho misek. První část tvořily páry samec – samice (režim „mated“) a druhou část tvořila slunéčka, která byla v Petriho misce sama, bez možnosti páření (režim „virgin“). Průběžně probíhalo odebírání hemolymfy u jedinců, kteří byli staří vždy přesně 1, 30 a 90 dní.

2.3 Odběr hemolymfy a počítání hemocytů

Před samotným odběrem hemolymfy bylo důležité si nachystat antikoagulační pufr podle (Firlej et al., 2012) a složení vypadalo následovně: na 1 ml pufru bylo třeba si odvážit 62 mM chloridu sodného, 100 mM glukózy, 30 mM citronanu sodného, 26 mM kyseliny citrónové a doplnit vodou.

Při samotném odebírání hemolymfy byla použita Petriho miska s oboustrannou lepící páskou. Slunéčka, která byla různě stará (dle stanovených režimů: 1, 30 a 90 dní) se vždy umístila na lepící pásku hrudní částí vzhůru, aby nemohla utéct a pomocí sterilního entomologického špendlíku bylo slunéčko drážděno v oblasti kloubů. Při dráždění těla slunéčka docházelo k reflexnímu krvácení, které se projevovalo únikem hemolymfy tak, že na povrchu se začaly objevovat nažloutlé kapičky hemolymfy. Hemolymfa získaná pomocí reflexního krvácení má přesně stejné vlastnosti jako hemolymfa kolující v tělní dutině (Knapp et al., 2018).

Kapičky hemolymfy byly postupně nasávány pomocí skleněné mikrokapilární trubičky, délka nasátých kapek hemolymfy byla změřena pomocí posuvného

železného měřítka a později byl objem hemolymfy vyfouknut do připravených, prázdných eppendorfek, kde byl již připravený pufr o objemu 50 μl . Jelikož se vzorky následně zmrazily a budou poslány kolegům do Brna za účelem dalších měření, bylo nutné, aby se odebralo minimální množství hemolymfy 0,5 μl (minimální vzorek nutný pro budoucí stanovení antimikrobiální aktivity). Vzorek hemolymfy bylo nutné následně doředit do poměru 1 μl čisté hemolymfy: 100 μl pufru. To znamená, že se zde jednalo o 101x ředěný vzorek. Dále bylo nutné celý objem zkumavky protřepat.

Následovalo počítání hemocytů. Prvním krokem bylo nanesení 7,5 μl ředěné hemolymfy na Bürkerovu počítací komůrku. Vzorek se nanesl na podložní sklo a došlo mi přiložení krycího sklíčka z důvodu, aby se ve vzorku neobjevovali vzduchové bubliny, které by mohly narušit korektní počítání hemocytů ve vzorku. Poté byl vzorek vložen pod světelný mikroskop. Po nastavení mikroskopu následovalo počítání hemocytů v prvních 50 velkých čtvercích, zvětšení bylo nastaveno na hodnotu 400 \times .

$$x = \frac{n}{0,4} \times \text{ředění}$$

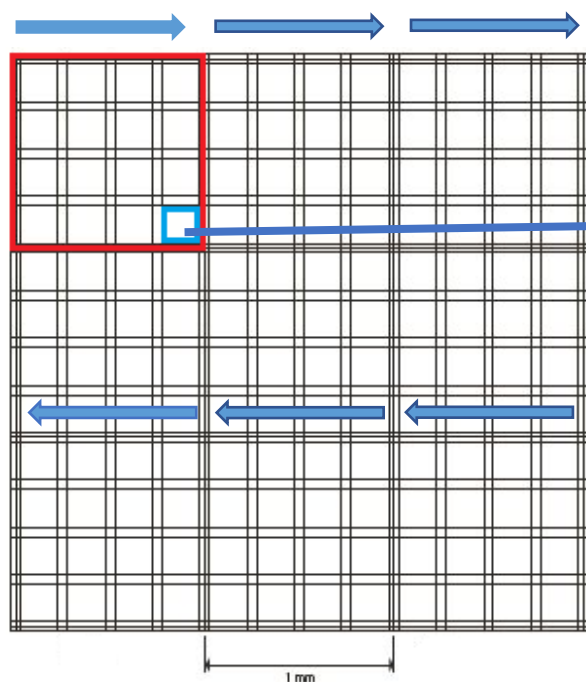
X = koncentrace hemocytů v 1 μl čisté hemolymfy

n = počet hemocytů ve 100 velkých čtvercích v Bürkerově komůrce

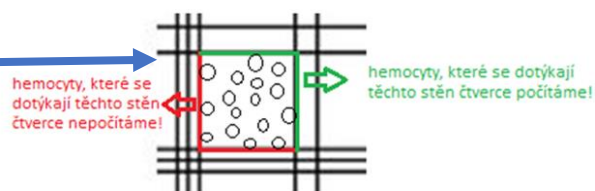
ředění = v tomto případě se jednalo o 101x

0,4 = celkový objem naředěné hemolymfy ve 100 velkých čtvercích v Bürkerově komůrce

Obrázek 1 Vztah pro výpočet koncentrace hemocytů (Řeřicha, 2018)



Hemocyty byly počítány v prvních 50 velkých čtvercích, k dopočítání krajních hemocytů sloužilo následující pravidlo :



Obrázek 2 Pravidlo počítání krajních hemocytů – vytvořeno v malování

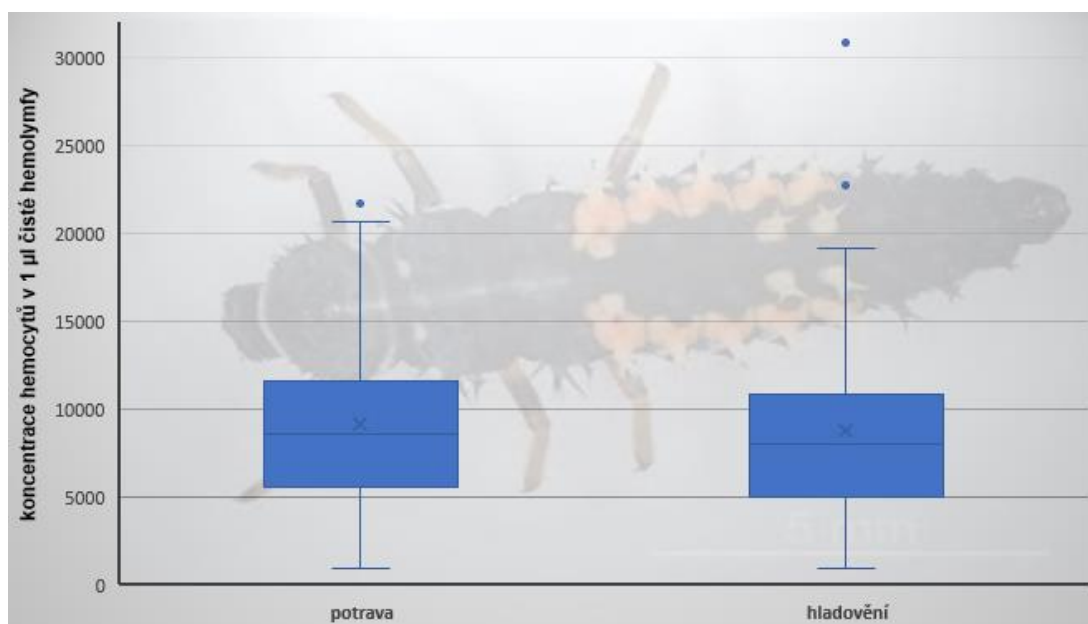
Obrázek 3 Vyznačení velkých/malých čtverců v Bürkerově komůrce + směr počítání – vytvořeno v malování

2.4 Analýza dat

Všechna data byla analyzována s pomocí zobecněného lineárního smíšeného modelu (GLMM; funkce glmmPQL) ve statistickém programu R (R version 3.6.3., 2020). Celkem byly použity dva modely. První model byl zaměřen na vliv potravy během 3. a 4. larválního instaru na imunitní systém 24 hodin starých dospělců. Jako závislá proměnná byla zvolena koncentrace hemocytů a jednalo se o spojitou proměnnou. Nezávislé proměnné byly celkem dvě, jedna z nich byla LarvalTR (STARVED/FOOD) = zda jedinci hladověli nebo přijímali potravu každý den a druhá z nezávislých proměnných byla pohlaví = Sex (M/F). V obou případech se tedy jednalo o kategoriální proměnné. Bylo zde použito quapoissonovo rozdělení z důvodu overdisperte.

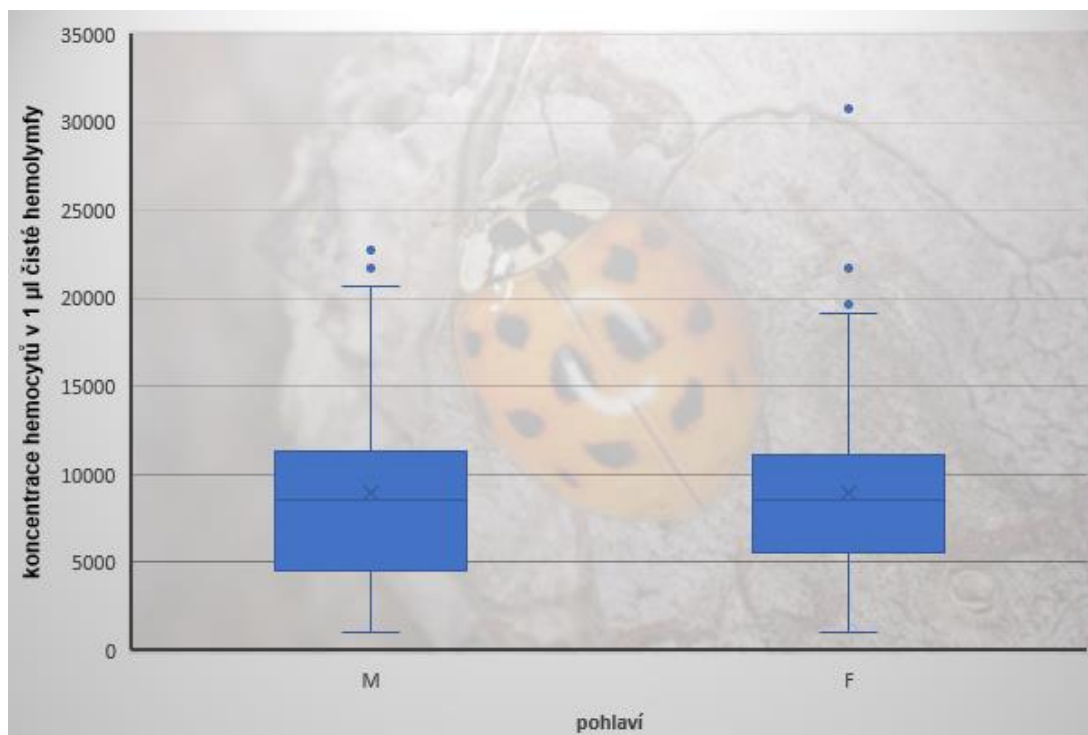
Druhý model byl zaměřen na koncentrace hemocytů v průběhu stáří dospělců. Jednalo se zde tedy o jednice, kteří byli staří 24 hodin, 30 a 90 dní. Tento model byl obdobný jako první, ovšem obsahoval více nezávislých proměnných. Ty byly doplněny o Period = stáří jedinců (A= 1 den; B= 30 dní; C= 90 dní), AdultTR (MATED/VIRGIN), což byly opět kategoriální proměnné. Model byl také doplněn o možné interakce mezi hlavními efekty. Bylo zde opět použité stejné rozdělení (quasipoissonovo) jako u předchozího modelu.

3 VÝSLEDKY



Obrázek 3 Přehled vlivu potravy v preimaginálním vývoji na koncentraci hemocytů u dospělých jedinců

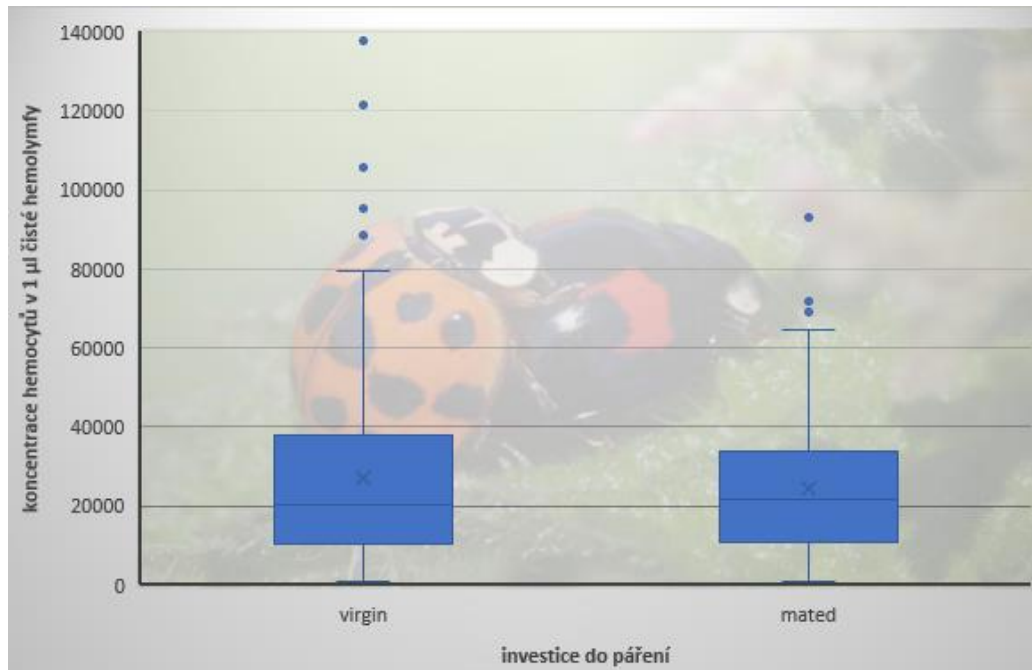
Vliv potravy (hladovění) během larválního vývoje na koncentraci hemocytů u jedinců, kteří byli 24 hodin staří, nebyl statisticky prokázán ($P = 0,515$; Obrázek 3).



Obrázek 4 Přehled vlivu pohlaví na koncentraci hemocytů u dospělých jedinců

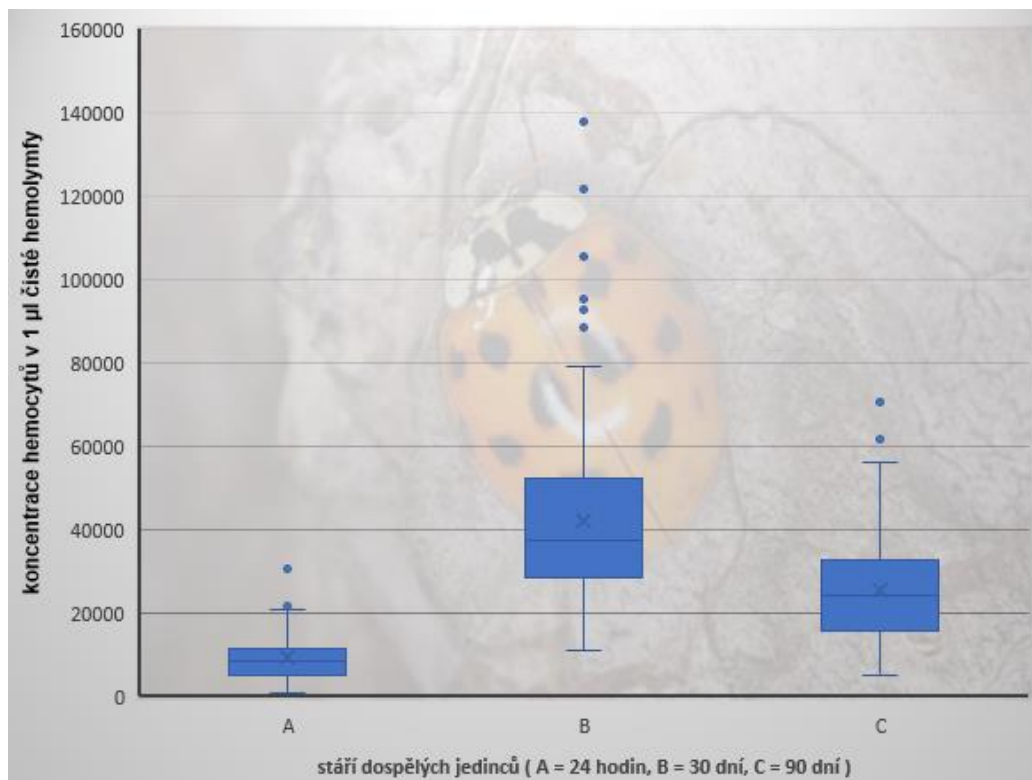
Neprůkazně vyšel také vliv pohlaví na koncentraci hemocytů těchto jedinců ($P = 0,842$; Obrázek 4).

Imunitní systém dospělých jedinců slunéček tak zřejmě není výrazně ovlivněn příjmem potravy v larválním stádiu, ani pohlaví neovlivňuje funkčnost mnoha studované složky imunitního systému slunéček v brzké dospělosti.



Obrázek 5 Přehled vlivu investice do páření na koncentraci hemocytů u dospělých jedinců

Průkazně, ovšem jen okrajově, vyšel vliv investice do páření na koncentraci hemocytů ($P = 0,045$; Obrázek 5).



Obrázek 6 Přehled vlivu ontogeneze na koncentraci hemocytů

Statisticky průkazně vyšel vliv stárnutí dospělců na koncentraci hemocytů ($P < 0,001$; Obrázek 6). Statisticky průkazně vyšel také vliv interakce mezi příjmem potravy v larválním stádiu a pohlavím ($P=0,035$).

4 DISKUZE

Imunitní systém hmyzu je ochranným mechanismem, který prošel velmi dlouhým evolučním vývojem a dnes tvoří poměrně složitý funkční systém. Základní úloha imunitního systému u všech živočichů po celý život zůstává stejná, chránit jedince před patogeny, negativními vlivy, zamezit zbytečnému úniku tekutin z těla a zajistit funkční ochranu, která povede k delšímu životu. Mezi další důležité úlohy patří například odstraňování vlastních buněk, které už pro tělo nemají význam (Ferenčík et al. 2005; Oku et al. 2019).

Bezobratlí živočichové patří mezi nejpočetnější organismy na naší planetě a liší se od obratlovců především tak, že disponují pouze specifickou imunitou (Hořejší & Bartůňková, 2005). Specifická imunita je druhem imunity, která reaguje na patogeny pomocí speciálních imunitních buněk (Toman, 2009). Dalším důležitým rozdílem v imunitních systémech těchto dvou skupin jsou imunitní buňky, které se podílejí na reakcích imunitního systému. U bezobratlých živočichů je imunitní systém tvořen hemocyty, které jsou přítomny v hemolymfě (Wigglesworth, 1972; Kodrík, 2004). Naopak u obratlovců je buněčný imunitní systém tvořen leukocyty. Dalším komponentem, který se podílí na imunitním systému obratlovců, jsou krevní destičky (Wigglesworth, 1972; Kodrík, 2004; Toman, 2009, Oku et al. 2019).

V otevřené přírodě se jedinci setkávají se stresovými faktory, které mohou ovlivnit jejich funkčnost imunitního systému (Kodrík, 2004). Také často dochází ke kombinaci několika stresorů zároveň (Walther, 2010). Faktorů je celá řada, ovšem ve své práci jsem se zaměřoval především na vliv potravy během preimaginálního vývoje a také na vliv reprodukce v dospělosti. Vlivem potravy na činnost imunitního systému se zabíralo několik studií. První studie proběhla na larvách motýlic (*Lestes viridis*). Larvy byly rozděleny do dvou skupin podle příjmu potravy-larvy, které přijímaly menší množství potravy, vykazují v dospělosti nižší fenoloxidázovou aktivitu a také jejich hemolymfa obsahuje nižší koncentraci hemocytů (Rolff, 2002). Druhý experiment proběhl na larvách komárů (*Anopheles gambiae*) a také na octomilce (*Drosophilla melanogaster*), výsledek se shodoval s předchozím experimentem, larvy, které hladověly, měly oslabený imunitní systém a také měly menší tukové zásoby (Foley et al. 2003; Agaisse, 2007; Fellous & Lazzaro, 2010; Janssens & Stoks, 2013; Arambourou & Stoks, 2015).

Pro porovnání byla použita ještě jedna studie na larvách šidélka páskovaného (*Coenagrion puella*) a byla také doplněna o porovnání s vlivem teploty na imunitní systém. Bylo zde dokázáno, že vliv potravy na mortalitu jedinců je o dost vyšší než u vlivu teploty, také se prokázalo, že jedinci s větším příjmem potravy žili déle, to znamená, že funkčnost jejich imunitního systému byla lepší než u hladovějících (Bayoh & Lindsay, 2003; Muturi et al. 2010).

Všechny zmíněné studie se shodly na výsledku, že příjem potravy ovlivňuje činnost imunitního systému. Výsledek může být vysvětlen teorií, že při nedostatku potravy dochází k metabolické depresi. Je tedy dost možné, že larvy disponovaly nižším množstvím energie, kterou mohly investovat do funkčního imunitního systému (Stoks et al. 2006). Můj experiment proběhl na larvách sluněčka východního (*Harmonia axyridis*). Uskutečnil se na larvách třetího a čtvrtého instaru, šlo zde o testování vlivu potravy na dospělé. Vliv potravy nebyl u mého experimentu statisticky průkazný. Výsledek může být vysvětlen tím, že larvy pravděpodobně investují málo do svého imunitního systému, to tedy znamená, že omezení potravy se nemuselo na funkci imunitního systému dostatečně projevit (Řeřicha et al. 2018).

Ontogeneze je další důležitý faktor, který dokáže ovlivnit funkčnost imunitního systému. První studie byla provedena na dospělých mravencích (*Acromyrmex octospinosus*), kde byli po dobu 48 hodin chováni a vystavováni patogenům. Starší mravenci disponovali lepším imunitním systémem než mravenci mladší (Armitage & Boomsma, 2010). Další experiment na toto téma provedl Smidtberg (Schmidtberg et al. 2013) na larvách prvního instaru octomilky (*Drosophilla melanogaster*) v porovnání s dospělými jedinci, kteří disponovali horší funkcí imunitního systému.

Dalším významný experiment proběhl v roce 2016 pod vedením Ing. Michala Knappa, Ph.D. a Ing. Michala Řeřichy. Studie proběhla na půdě České zemědělské univerzity v Praze a zabírala se vlivem ontogeneze na imunitní systém sluněčka východního (*Harmonia axyridis*). Podle studie má průběh ontogeneze důležitý vliv na imunitní systém jedince (Řeřicha et al. 2018). Larvy měly podstatně nižší koncentraci hemocytů než dospělí jedinci (Řeřicha et al. 2018). Larva musí investovat přednostně energii do rychlého růstu a vývoje, a tím sníží energii do imunitního systému (Řeřicha et al. 2018). Koncentrace hemocytů u dospělých jedinců v průběhu stáří pomalu stoupala. V mém experimentu jsem zkoumal koncentrace hemocytů u dospělých jedinců, kteří byli staří 24 hodin, 30 dní a 90 dní. Výsledek se shodoval s předešlým

experimentem, koncentrace hemocytů u dospělých jedinců do 30. dne života pomalu stoupala, ovšem od 30. do 90. dne života koncentrace začala klesat. To může být vysvětleno nižší imunitní efektivitou, která je spojena s přibývajícím věkem (Amdam et al. 2005).

Vlivem pohlaví u bezobratlých se zabíral již A. J. Bateman. Experiment pod jeho vedením byl proveden na dospělých jedincích octomilky (*Drosophilla melanogaster*), jedinci se mohli pářit podle libosti a byla zde sledována jejich reprodukční úspěšnost. Ta vyšla v průměru u obou pohlaví podobně, ovšem lišily se odchylky u samců a samic. Vysvětlení tohoto jevu je zřejmě to, že samice obecně investují více do svého imunitního systému, aby se mohly dožít vyššího věku a plodit více potomků, u samců jde spíše o co nejvyšší počet páření se samicemi, to tedy znamená, že nemají tolik energetických zdrojů, které by mohli investovat do funkčnosti imunitního systému (Rolff, 2002).

V mé experimentální části bakalářské práce jsem zkoumal vliv pohlaví u dospělých jedinců ve věku 24 hodin až 30 dní na jejich imunitní systém. Výsledek byl takový, že vliv pohlaví nebyl potvrzen. Výsledek mohl být pravděpodobně ovlivněn tím, že energetická investice do imunitního systému mezi pohlavími se může projevit až v pozdější fázi života, jelikož pohlaví investují svou energii do imunitního systému na základě jejich reprodukčního úsilí.

5 ZÁVĚR

Imunitní systém prošel dlouhým vývojem a je pro všechny organismy na naší planetě velmi důležitý (především z hlediska obrany před patogeny). U bezobratlých živočichů se vyskytuje pouze specifická imunita, kterou dělíme podle reakcí na buněčnou a humorální. V mé bakalářské práci jsem se zaměřoval především na buněčnou část u slunéčka východního (*Harmonia axyridis*) a celkově byla práce rozdělena na rešeršní a experimentální část. Rešeršní část práce byla zaměřena na dosavadní poznatky imunitního systému hmyzu a experimentální část práce se zabývala zjištěním koncentrací hemocytů. Součástí experimentální práce bylo také zkoumání toho, jak mohou určité faktory (příjem potravy během preimaginálního vývoje, vliv reprodukce a pohlaví u dospělých jedinců a vliv stárnutí) ovlivnit koncentraci hemocytů.

V experimentální části byl potvrzen vliv ontogeneze a reprodukce na koncentraci hemocytů (buněčný imunitní systém). U vlivu potravy byly výsledky mé studie v rozporu s dosud provedenými experimenty. Tento výsledek byl pravděpodobně ovlivněn tím, že larvy ve třetím a čtvrtém instaru tolik neinvestují do funkčnosti buněčného imunitního systému. Nemůžu také vyloučit fakt, že jsem mohl udělat drobné chyby při procesu počítání hemocytů (jednalo se o můj první experiment se slunéčky). U vlivu pohlaví na imunitní systém podle Batmanova principu se výsledky mé studie také neshodovaly. Důvodem může být hypotéza, že dospělí jedinci samců nebyli dostatečně reprodukčně aktivní, tudíž investovali více energie do funkčnosti svého imunitního systému.

Imunitní systém nejen slunéčka východního je stále málo probádán a chtělo by do budoucna provést více podobných studií, které by obohatily společnost o nové poznatky. Díky kterým by se dalo imunitnímu systému invazního slunéčka více porozumět nebo pochopit další zákonitosti ve fungování imunitního systému hmyzu. Jelikož byli v mém experimentu zkoumáni dospělí jedinci do stáří 90 dnů života. Bakalářská práce slouží jako doplněk existující studie (Řeřicha et al. 2018), jelikož zde bylo zkoumáno stáří jedinců až do 90 dne stáří.

Jsem rád, že jsem dostal možnost tento experiment absolvovat a přemýšlím nad tím, že bych se rád imunitním systémem hmyzu zaobíral i v budoucnu.

6 PŘEHLED LITERATURY A POUŽITÝCH ZDROJŮ

Adamo S.A., Jensen M., Younger M., 2001: Changes in lifetime immunocompetence in male and female *Gryllus texensis* (formerly *G. integer*): Trade offs between immunity and reproduction. *Animal Behaviour* 62(3), 417-425.

Agaisse H., 2007: An adaptive immune response in *Drosophila* *Cell Host Microbes* 1, 91-93.

Armitage S.A.O., Boomsma J.J., 2010: The effects of age and social interactions on innate immunity in a leaf-cutting ant. *Journal of Insect Physiology* 56(7), 780-787.

Bateman A.J., 1948: Intra-sexual selection in *Drosophila*. *Heredity* 2, 349-368.

Brivio M.F., Mastore M., Pagani M., 2005: Parasite-host relationship: a lesson from a professional killer. *Invertebrate Survival Journal* 2(1997), 41-53.

Dinh K.V., Janssens L., Stoks R., 2016: Exposure to a heat wave under food limitation makes an agricultural insecticide lethal: a mechanistic laboratory experiment. *Global change biology* 22(10), 3361-3372.

Foley E., O'Farrell, P.H., 2003: Nitric oxide contributes to induction of innate immune responses to gram-negative bacteria in *Drosophila*. *Genes and Development* 17, 115-125.

Fellous S., Lazzaro B.P., 2010: Larval food quality affects adult immune gene expression independent of effects on general condition. *Molecular Ecology* 19(7), 1462-1468.

Ferenčík M., Rovenský J., Shoenfeld Y., Mat'ha V., 2005: Imunitní systém informace pro každého. Grada Publishing, Praha.

Finkel T., Holbrook N.J., 2000: Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408, 239-247.

Gibbs A.G., Fukuzato F., Matzkin L.M., 2003: Evolution of water conservation mechanisms in *Drosophila*. *J Exp Biol* 206, 1183-1192.

Gibbs A.G., Matzkin L.M., 2001: Evolution of water balance in the genus *Drosophila*. *J Exp Biol* 204, 2331-2338.

Gupta P., 2001: Immunology of invertebrates: Humoral. *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley and Sons, London.

Hodek I., Honěk A., van Emden H.F., 2012: Ecology and Behaviour of the Ladybird Beetles (*Coccinellidae*). Willey-Blackwell, U.

Honěk A., Soares A.O., Skuhrovec J., 2017: Spatial and temporal changes in the abundance and composition of ladybird (*Coleoptera: Coccinellidae*) communities. *Current opinion in insect science* 2017, 61-67.

- Hořejší V., Bartůňková J., 2005:** Základy imunologie. Triton, 21-30.
- Hyršl, P., 2018 a:** Imunita hmyzu a dalších bezobratlých živočichů. 1 Živa, 32-34.
- Hyršl, P., 2018 b:** Imunita hmyzu a dalších bezobratlých živočichů. 2 Živa, 91-93.
- Chapman R.F., 2013:** The Insects Structure and Function. Cambridge University.
- Kelly C.D., Stoehr A.M., Nunn C., Smyth K.N., Prokop Z.M., 2018:** Sexual dimorphism in immunity across animals: a meta-analysis. *Ecology Letters* 21(12), 1885-1894.
- Kerkut G.A., Gilbert L.I., 1985:** Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology. Pergamon Press, Oxford.
- Koegel S., Eben A., Hoffmann C., Gross J., 2012:** Influence of diet on fecundity, immune defense and content of 2-isopropyl-3-methoxypyrazine in *Harmonia axyridis* Pallas. *Journal of Chemical Ecology* 38, 854-864.
- Kurtz J., Armitage S.A.O., 2006:** Alternative adaptive immunity in invertebrates. *Trends in Immunology* 27(11), 493-496.
- Lazzaro B.P., Little T.J., 2009:** Immunity in a variable world. *Philosophical Transactions of the Royal Society* 364, 15-26.
- Lazzari, Brian P., Rolff J., 2011:** Danger, microbes and homeostasis. *Science* 2011, 43-44.
- Lazzaro B.P., Little T.J., 2009:** Immunity in a variable world. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364, 15-26.
- Lemaitre B., Hoffmann J., 2007:** The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual review of immunology* 25, 697-743.
- Lombaert E., Guillemau T., Thomas C.E., 2011:** Inferring the origin of populations introduced from a genetically structured native range by approximate Bayesian computation: case study of the invasive ladybird *Harmonia axyridis*. *Molecular Ecology* 20, 4654-4670.
- Moreno - García M., Condé R., Bello - Bedoy R., Lanz- Mendoza H., 2014:** The damage threshold hypothesis and the immune strategies of insects. *Infection, Genetics and Evolution* 24, 25-33.
- Muturi E.J., Kim C.H., Alto B.W., Berenbaum M.R., Schuler M.A., 2011:** Larval environmental stress alters *Aedes aegypti* competence for Sindbis virus. *Tropical Medicine and International Health* 16(8), 955-964.
- Nation J.L., 2002:** *Insect Physiology and Biochemistry*, CRC Press, Boca Raton.
- Nedvěd O., 2014:** Slunéčko východní (*Harmonia axyridis*) - pomocník v biologickém boji nebo ohrožení biodiverzity? Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice.

- Nedvěd O., Háva J., Kulíková D., 2011:** Record of the invasive alien ladybird *Harmonia axyridis* (Coleoptera, Coccinellidae) from Kenya. *Zoo Keys* 106, 77-81.
- Oku K., Wedell N., 2019:** *Animal Biology* 69, 117-136.
- Rolff J., 2002:** Bateman's principle and immunity, *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 269(1493), 867-872.
- Rolff J., 2001:** Effects of age and gender on immune function of dragon flies Odonata, Lestidae from a wild population. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie* 79, 2176-2180.
- Rolff J., Siva-Jothy M.T., 2002:** Copulation corrupts immunity: a mechanism for a cost of mating in insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 9916-9918.
- Rolff J., Siva-Jothy M.T., 2003:** Invertebrate ecological immunology. *Science* 301, 472-475.
- Řeřicha M., Dobeš P., Hyršl P., Knapp M., 2018:** Ontogeny of protein concentration, haemocyte concentration and antimicrobial activity against *Escherichia coli* in haemolymph of the invasive harlequin ladybird *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Physiological Entomology* 43(1), 51-59.
- Sinclair B.J., Ferguson L.V., SalehipourShirazi G., Macmillan H.A., 2013:** Crosstolerance and cross-talk in the cold: Relating low temperatures to desiccation and immune stress in insects. *Integrative and Comparative Biology* 53(4), 545-556.
- Stoks R., De Block M., Slos S., Van Doorslaer W., Rolff A.J., 2006:** Time constraints mediate predator-induced plasticity in immune function, condition, and life history. *Ecology* 87, 809-815.
- Schmid-Hempel P., 2005:** Evolutionary ecology of insect immune defenses. *Annual Review of Entomology* 50, 529-551.
- Schmidtberg H., Röhrich CH., Vogel H., Vilvinskis A., 2013:** A switch from constitutive chemical defence to inducible innate immune responses in the invasive ladybird *Harmonia axyridis*. *Biology Letters* 9, 20130006.
- Schwenke R.A., Lazzaro B.P., 2017:** Juvenile hormone suppresses resistance to infection in mated female *Drosophila melanogaster*. *Curr. Biol.* 27, 596-601.
- Schwenke R.A., Lazzaro B.P., Wolfner M.F., 2016:** Reproduction-immunity trade-offs in insects. *Annu. Rev. Entomol* 61, 239-256.
- Šíma P., 1997:** Vývoj imunitních strategií v živočišné říši. *Živa* 1, 25-27.
- Skuhrovec J., 2018:** Slunéčko východní -,„užitečná“ invaze? *Živa* 5, 261-263.

Triggs A., Knell R.J., 2012: Interactions between environmental variables determine immunity in the Indian meal moth *Plodia interpunctella*. *Journal of Animal Ecology* 81(2), 386-394.

Triggs A., Knell R.J., 2012: Parental diet has strong transgenerational effects on offspring immunity. *Functional Ecology* 26, 1409–1417.

Turner R.J., 1994: *Immunology - a comparative approach*. John Wiley and Sons, Chichester.

Wilson K., Knell R., Boots M., Koch-Osborne J., 2003: Group living and investment in immune defence: an interspecific analysis. *Journal of Animal Ecology* 72, 133-143.

Wigglesworth V.B., 1972: *The Principles of Insect Physiology*. Chapman & Hall, London.

7 PŘÍLOHY

Přehled příloh:

Příloha 1 Slunéčko východní v Petriho misce

Příloha 2 Roztřídění dospělých jedinců slunéček

Příloha 3 Počítání hemocytů pod mikroskopem

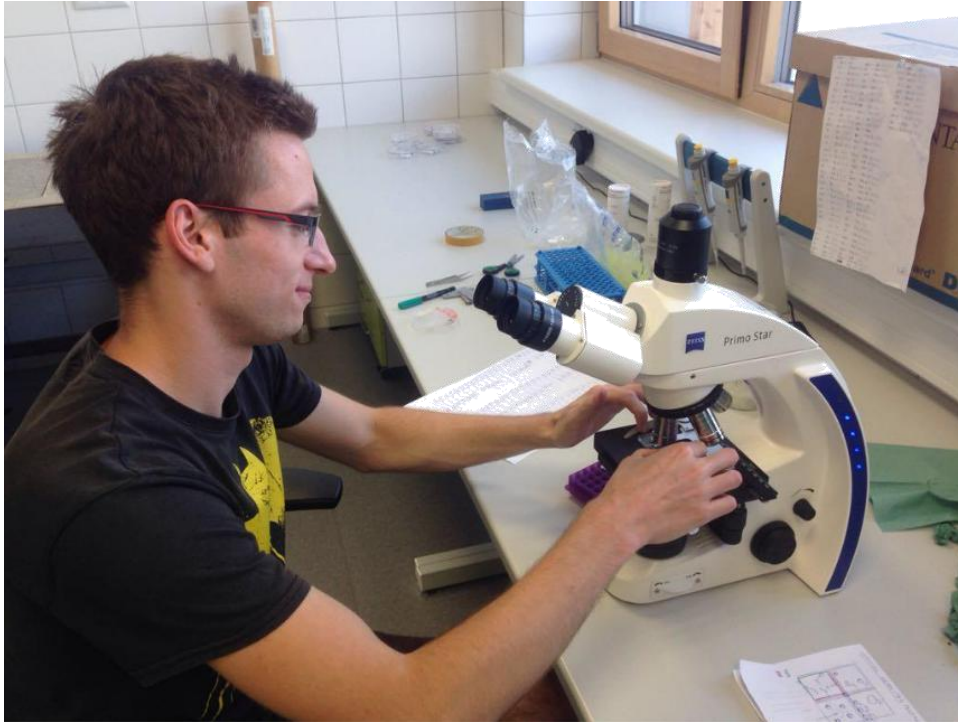
Příloha 4 Počítání hemocytů pod mikroskopem 2



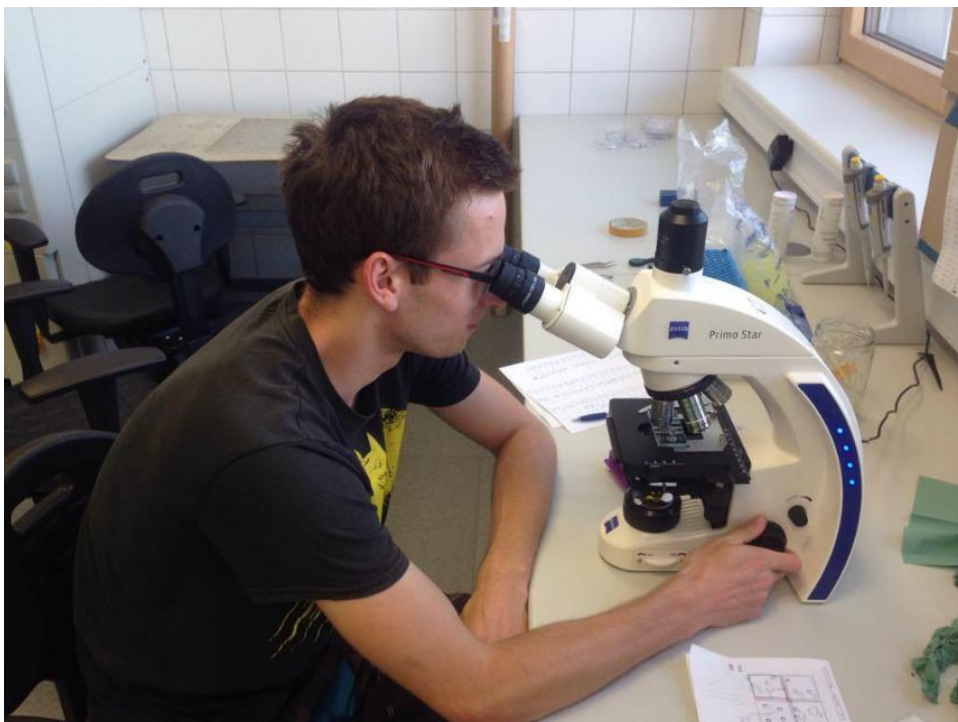
Příloha 1 Slunéčko východní v Petriho misce



Příloha 2 Roztřídění dospělých jedinců slunéček



Příloha 3 Příprava před počítáním hemocytů



Příloha 4 Počítání hemocytů pod mikroskopem