

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

**Změny v produkci adipokinetických hormonů u
Pyrrhocoris apterus v různých částech CNS po působení
stresových faktorů**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:

Jakub Vávra

Vedoucí práce:

prof. RNDr. Dalibor Kodrík, CSc.

Místo a rok vydání:

České Budějovice, 2019

Vávra J., 2019: Změny v produkci adipokinetických hormonů u *Pyrrhocoris apterus* v různých částech CNS po působení stresových faktorů. [Changes in production of adipokinetic hormones in different compartments of CNS after the application of stress factors. Bachelor thesis, in Czech] – 40p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotation

The main goal of this bachelor thesis was to characterize changes of adipokinetic hormone (AKH) production in the brain and corpora cardiaca of the firebug *Pyrrhocoris apterus* during the infection caused by entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*. The effects of the pathogen were investigated by determination of AKH level in the CNS using competitive ELISA test and immunohistochemical localization with a specific antibody against the *P. apterus* AKH (Pyrap-AKH). The results confirmed presence of majority of AKH in corpora cardiaca and smaller amount also in brain. The infection increased AKH production in both monitored organs, however, in brain the elevation was more intensive than that in corpora cardiaca.

Prohlášení

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

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, 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 16. dubna 2019

.....

Jakub Vávra

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval svému školiteli prof. RNDr. Daliboru Kodříkovi CSc. za obdivuhodnou trpělivost při vedení této bakalářské práce, a to jak během práce v laboratoři, tak při zpracovávání výsledků. Mé vřelé díky patří i členům laboratoře za milé uvedení do problematiky a za přátelské prostředí, ve kterém jsem měl tu radost pracovat. Rovněž bych rád vyjádřil díky Emadu Ibrahimovi A. S., MSc. za odborné konzultace a rady při nakládání s entomopatogenními nematody. V neposlední řadě bych rád také poděkoval svým přátelům a všem, kdo mi do života přinesli jak znalostní, tak volnočasový prožitek.

Obsah

1. Úvod	1
1.1. Endokrinní soustava hmyzu.....	1
1.2. Reakce hmyzu na stres (<i>stress response</i>).....	3
1.3. Adipokinetický hormon (AKH).....	4
1.3.1. AKH jako chemické individuum.....	4
1.3.2. Lokalizace AKH v centrální nervové soustavě	5
1.3.3. Signalizační kaskáda AKH a jeho funkce	6
1.3.4. Role AKH ve stresu vyvolaném toxiny a patogeny	7
1.4. Entomopatogenní hlístice (EPN)	9
1.4.1. Nematobakteriální komplex <i>Steinernema-Xenorhabdus</i>	10
1.4.2. Průběh intoxikace entomopatogenními nematody	10
1.4.3. Metabolity a virulence <i>Steinernema-Xenorhabdus</i>	11
1.4.4. Obrana hmyzu před nematobakteriální infekcí.....	12
2. Cíle práce	14
3. Materiály a metody	15
3.1. Modelový druh hmyzu: ruměnice pospolná; <i>Pyrrhocoris apterus</i>	15
3.2. Modelový druh háďátka: <i>Steinernema carpocapsae</i> , a vyvolání infekce u ploštic	15
3.3. Testy mortality.....	16
3.4. Pitva CNS a extrakce adipokinetických hormonů	16
3.5. Imunohistochemická lokalizace AKH.....	17
3.6. Kvantifikace adipokinetických hormonů pomocí kompetitivního ELISA testu .	18
3.7. Zpracování výsledků.....	19
4. Výsledky	20
4.1. Vliv infekce entomopatogenními nematody na mortalitu	20

4.2. Imunohistochemická lokalizace AKH v centrální nervové soustavě	22
4.3. Kvantitativní stanovení AKH v centrální nervové soustavě.....	24
5. Diskuze.....	25
6. Závěr	28
7. Seznam citované literatury	29

1. Úvod

1.1. Endokrinní soustava hmyzu

Endokrinní soustava hmyzu reprezentuje mezi bezobratlými nejlépe probádaný a nejsofistikovanější systém. Rozlišujeme zde dvě hlavní hormonální soustavy fungující vzájemně v těsné závislosti a dále pak 2-3 skupiny buněk/tkání s endokrinní funkcí:

1. Mozek a přilehlé žlázy zahrnují:

- Neurosekretorické monopolární buňky mozkových hemisfér
- Corpora cardiaca (CC): Nachází se v blízkosti mozku a nasedají na aortu. Slouží jako neurohemální orgán pro mozkové neurohormony vzhledem k ústí axonů neurosekretorických buněk. Kromě toho jsou CC schopna i syntézy některých neuropeptidů (AKH).
- Corpora allata (CA): Jedná se o zpravidla párovou žlázu nacházející se v posteriorní oblasti hlavy; někdy však obě části splývají v jeden orgán (Diptera, Hemiptera). Jejich hlavní funkcí je produkce juvenilních hormonů.

2. Prothorakální žlázy

Žlázy nepravidelného tvaru vyskytující se v oblasti prvního hrudního článku (prothoraxu), produkují svlékací hormony – ecdysteroidy. Prothorakální žlázy se primárně vyskytují u nedospělých stádií a u imág zpravidla chybí.

3. Další endokrinní centra zahrnují:

- Neurosekretorické buňky ostatních ganglií: Nacházejí se v gangliích břišní nervové pásky a do hemolymfy uvolňují neuropeptidy.
- Endokrinní buňky střeva: Jejich existence byla prokázána pouze imunohistochemicky. Předpokládá se, že produkují hormony účastnící se trávicích procesů
- Epitracheální žlázy: Celky buněk nacházející se v oblasti spirakula, kde nasedají na tracheu. Jsou zodpovědné za produkci ecdysis triggering hormonů (ETH; nemají český název)

Všechny endokrinní orgány produkují základní tři skupiny hormonů:

1. Ekdysteroidy

Tzv. *svlékací hormony* zodpovídají za svlékání larev, nymf a slouží také k reprodukci dospělců. Základní je hormon ekdyson (steranové jádro – odvozený od cholesterolu). Jsou vylučované především prothorakálními žlázami, ale také epidermis a gonádami. U hmyzu mají mnoho dalších důležitých funkcí.

2. Peptidické hormony

Látky peptidické povahy vylučované do hemolymfy neurosekretorickými buňkami mozku a jiných částí CNS. U většiny těchto neuropeptidů byl popsán pleiotropní účinek, což znamená, že mají obvykle celou řadu různých funkcí. Kromě typicky hmyzích neuropeptidů můžeme v těle hmyzu najít i analogy savčích hormonů, které mohou mít podobné nebo i odlišné funkce jako/než je tomu u savců. Podle typu jejich působení na organismus je můžeme rozdělit do skupin (v těchto skupinách uvádím vždy pouze jednoho nebo jen několik významných zástupců, protože počet hmyzích neuropeptidů se dnes odhaduje na několik stovek):

a. Hormony řídící metabolismus a homeostázu

Adipokinetické hormony (AKH) z rodiny RPCH/AKH (**red pigment concentrating hormone/adipokinetic family**). K jejich syntéze a uvolnění dochází hlavně v CC (Gäde a kol., 1997; Nässel a Winther, 2010), nicméně malé množství se syntetizuje i v neurosekretorických buněk mozku (Schooneveld a kol., 1985; Moshitzky a kol., 1987a; Bray a kol., 1993; Clottens a kol., 1989; Kaufmann a kol., 2009; Kodrík a kol., 2003). Primárním signálem pro uvolnění hormonů do hemolymfy je zvýšená potřeba energie nebo jiné působení stresu (podrobně viz níže).

b. Hormony řídící metamorfózu, růst a vývoj

Prothoracikotropní hormon (PTTH; dříve známý jako aktivační hormon). K jeho syntéze dochází v neurosekretorických buňkách protocerebra. Základní funkcí PTTH je stimulace syntézy a uvolňování ekdysteroidů. K samotnému uvolňování dochází pouze v určitou denní dobu, aby došlo k synchronizaci s denními rytmy.

Do této skupiny hormonů dále patří allatostatiny a allatotropiny. Jedná se o neuropeptidy řídící sekreci juvenilního hormonu.

Eklozní hormony (ETH) a *ecdysis triggering* hormony jsou hormony ovlivňující svlékání a eklozní chování.

c. *Hormony řídící pohlavní funkce*

Tzv. gonádotropní hormony představují skupinu neurohormonů stimulující pohlavní funkce jako jsou: vývoj ovarií, transport zásobních látek, syntézu ecdysteroidů apod.

d. *Hormony ovlivňující svalovou kontrakci*

Jedná se o početnou skupinu neurohormonů stimulujících svalovou činnost u hmyzu. Modifikují aktivitu svaloviny střev, srdce i skeletální svaloviny. Typickým zástupcem je proctolin, který stimuluje rytmické kontrakce vnitřních orgánů a působí také jako neuromodulátor viscerální a kosterní svaloviny.

e. *Hormony řídící barvoměnu (chromatotropiny)*

Řídí barevné změny, které souvisí s distribucí pigmentů v kutikule i epidermálních buňkách. Nejznámějším zástupcem je PDF (**p**igment **d**ispersing **f**actor).

3. Juvenilní hormony

Z chemického hlediska se jedná o sesquiterpeny odvozené od farneholu. Jejich primární funkcí je udržovat jedince v nedospělém stádiu (odtud pochází jejich jméno), zasahují však do řady aspektů hmyzího života (kastrovní systém, metamorfóza, vývoj ovarií, embryogeneze, larvální a imaginální diapauza atd.) K jejich syntéze dochází v CA.

1.2. Reakce hmyzu na stres (*stress response*)

Vzhledem ke své pozici v potravním řetězci byl na hmyz v průběhu evoluce vyvíjen extrémní tlak, proto je hmyz skupinou živočichů s velmi dobře vyvinutou odpovědí na různé stresory. Díky tomu byl hmyz schopný nejenom přežít, ale diverzifikovat se do podoby jakou dnes známe a modulovat fyziologické pochody k maximalizaci účinnosti (Adamo, 2017).

Reakce na stres je definována jako fyziologická odpověď organismu na neoptimální podmínky. Můžeme ji rozdělit dle jejích dějových pořadí v organismu na – molekulární, buněčnou, fyziologickou a behaviorální.

Hmyz má na různé stresory různé typy odpovědí. Hlavními stresory u hmyzu jsou metabolický stres (hladovění) a účinek patogenů (infekce, parazitace):

- Metabolický stress a hladovění: Jedná se o nejčastější stresor ovlivňující organismus po celý jeho život. Do hormonální odpovědi na hladovění se zapojuje celá řada

hormonů od biogenních aminů (oktopamin, dopamin, serotonin) až po neurohormony (Downer, 1979).

- Působení patogenů: Hormonální reakce organismu na infekci a parazitaci napomáhají k optimalizaci dané imunitní odpovědi (Adamo, 2017). Během infekce dochází u většiny hmyzu k aktivaci buněčných a humorální obranných reakcí (Chapman, 1998). Předpokládá se, že minimálně některé z těchto reakcí jsou pod hormonální kontrolou. Je prokázáno třeba zapojení AKH do 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).

1.3. Adipokinetický hormon (AKH)

Adipokinetické hormony jsou v dnešní době nejlépe studovanou skupinou peptidických neurohormonů hmyzu. Jak již název vypovídá, prvně objevená funkce AKH byla charakterizována u sarančete stěhovavé *Locusta migratoria* (Stone a kol., 1976), kde Locmi-AKH-I přímo stimuloval aktivaci lipidických zásob. Celá rodina adipokinetických hormonů dnes čítá přes 60 zástupců a jejich funkce jsou velmi komplexní. Obdobou AKH u obratlovců je hormon glukagon (Alquicer a kol., 2009).

1.3.1. AKH jako chemické individuuum

Z chemického hlediska jsou AKH obvykle malé okta až deka-peptidy. Níže je uvedena primární struktura dvou AKH, které se nachází v těle modelového organismu *Pyrrhocoris apterus* (Kodrík a kol., 2000; 2002).

1. Pyrap-AKH (*Pyrrhocoris apterus* – adipokinetický hormon): pGlu-Leu-Asn-Phe-Thr-Pro-Asn-Trp-NH₂

2. Peram-CAH-II (*Periplaneta americana* - cardioaccelerating hormone-II: pGlu-Leu-Thr-Phe-Thr-Pro-Asn-Trp-NH₂

AKH molekula má N-konec blokováný p-Glu (kys. pyroglutamová) a C-konec je amidovaný. Přičemž obsahuje alespoň jednu aromatickou aminokyselinu, a to obvykle Phe v 4. pozici

(Gäde a kol., 1997). Výjimku tvoří Vanca-AKH u motýla *Vanessa cardui*. V tomto případě se jedná o peptid složený z jedenácti aminokyselin (Köllisch a kol., 2000).

Každé AKH má specifickou m-RNA, která je translatována do pre-pro-hormonů, které mají konzervovanou strukturu s charakteristickým hydrofobním peptidem následovaný jedním aktivním AKH s navázaným asociovaným peptidem (Noyes a kol., 1995). Funkce těchto asociovaných peptidů není dnes ještě známa. Pravděpodobně hrají roli při kumulaci v sekrečních granulích (Van der Horst a kol., 2001) nebo se jedná o signální molekulu pro degradaci nesprávně sbalených sekrečních produktů (Bassetti a kol., 1995).

1.3.2. Lokalizace AKH v centrální nervové soustavě

Adipokinetické hormony jsou syntetizovány, ukládány a vylučovány převážně neurosekretorickými buňkami žláz CC (Gäde a kol., 1997; Nässel a Winther, 2010). Avšak bylo zdokumentováno, že u druhů, *Locusta migratoria* (Schooneveld a kol., 1985; Bray a kol., 1993), *Carausius morosus* (Clottens a kol., 1987), *Aedes aegypti* (Kaufmann a kol., 2009) nebo *P. apterus* (Kodrík a kol., 2003) byla přítomnost AKH prokázána i v mozku. Například ve studii Kodrík a kol. (2003) byl výskyt AKH u *P. apterus* detekován v axonech 140 neurosekretorických buněk neuropilárních částí mozku. Nicméně v mozku se vyskytuje pouze relativně malé množství AKH: u samic *P. apterus* jsou to jen 3% celkového množství AKH v CNS (Kodrík a kol., 2015a). Funkce AKH v samotném mozku není úplně objasněna, předpokládá se ale, že by mohl hrát roli při nervové signalizaci jako neurotransmitter (Milde a kol., 1995). To se potvrdilo v práci Kodříka a kol. (2015b), kde stres vyvolaný injekcí hyperosmotického roztoku (3 μmol KCl; LD₆₀) zvýšil hladinu AKH v mozku 7x, zatímco v CC bylo zvýšení jen asi 1,2 násobné. Lze předpokládat, že takový osmotický šok vyvolal zvýšení nervové aktivity v CNS.

Naopak u *Drosophila melanogaster* nebyla přítomnost Drome-AKH v mozku prokázána, jeho výskyt byl imunohistochemicky potvrzen pouze v kruhové žláze, která obsahuje buňky corpora cardiaca (Noyes a kol., 1995; Nässel, 2002).

Samotná syntéza pro-hormonů probíhá na endoplasmatickém retikulu neurosekretorických buněk, odkud jsou pak transportovány do sekrečních granulí (2 typy) – u *L. migratoria* o velikosti až 300 nm, kde dochází k jejich zrání v aktivní AKH. Druhým typem granulí u *L. migratoria* jsou tzv. intracisternální granule (5 μm) sloužící jako zásobárny pro-hormonálního

AKH čekajícího na svou aktivaci podle fyziologických potřeb organismu (Van der Horst a kol., 2001; Diederer a kol., 2002). Sekretorické granule pozorované u *P. apterus* jsou mnohem menší než granule popsané u *L. migratoria* (Kodrík a kol., 2015a).

Plně aktivované hormony jsou následně exocytózou vyloučeny do hemolymfy.

1.3.3. Signalizační kaskáda AKH a jeho funkce

Primárním signálem pro sekreci hormonu do hemolymfy je nutnost zvýšit hladinu metabolismu (pohyb, infekce, zranění, kontakt s toxiny, insekticidy atd.), přičemž výdej AKH je přesně hlídán zpětnovazebně hladinou metabolitů. Hemolymfou se AKH dostává k cílovým buňkám (primárně tukové těleso), kde se váže na specifický membránový receptor. AKH receptory se podařilo charakterizovat u *D. melanogaster*, bource morušového *Bombyx mori* (Park a kol., 2002; Staubli a kol., 2002), švába amerického *Periplaneta americana* (Wicher a kol., 2006), komára *Anopheles gambiae* (Kaufman a Brown, 2006) a u některých dalších druhů. Receptory adipokinetických hormonů jsou strukturálně podobné receptorům z *gonadotropin-releasing* hormon rodiny známé u obratlovců. Na receptoru se hormonální signál převádí na intracelulární a dochází buď k aktivaci dráhy adenylát cyklázy nebo fosfolipázy C (což bývá druhově specifické). Za přítomnosti volných Ca^{2+} iontů se pak aktivuje proteinkinázová kaskáda, která spouští buď mobilizaci lipidů (aktivace lipáz) nebo glycidů (aktivace glykogen fosforylázy). Je zajímavé, že u některých hmyzích zástupců slouží jako energetický substrát aminokyselina prolin (Gäde a Auerswald, 2003).

Hlavními transportními energetickými substráty u hmyzu mobilizovanými vlivem AKH jsou diacylglycerol a trehalóza. Diacylglycerol, který vzniká štěpením triacylglycerolů, se následně exponuje na povrch tukové buňky. Zde se diacylglycerolová molekula váže na HDLp (high density lipophorin), komplex se mění na LDLp (low density lipophorin) a je transportován do místa spotřeby, což je např. pracující svalstvo nebo místo infekce apod. (Gäde a Auerswald, 2002; 2003). V cílové tkáni nasedá LDLp na specifický lipophorinový membránový receptor, jehož citlivost je rovněž zvýšena AKH a dochází k předání diacylglycerolu do buňky. LDLp se tím mění na HDLp, který se tak stává novým nosičem pro transport další molekuly diacylglycerolu. V cílové buňce dochází k enzymatickému rozkladu diacylglycerolu lipázou na glycerol a mastné kyseliny. Ty jsou následně odbourávány a slouží jako zdroj energie. Trehalóza je ve vodě rozpustný neredukující disacharid D-glukózy (Maquenne, 1891;

C₁₂H₂₂O₁₁). Při enzymatickém rozkladu trehalázou vznikají tak dvě glukózová jádra. Odolnost vůči kyselé hydrolyze a neschopnost vzniku intramolekulárních vodíkových můstků ji činí chemicky zcela jedinečnou v porovnání s ostatními disacharidy (společně se sacharózou). U hmyzu byla poprvé objevena v 1858 (Berthelot) u zástupců brouků nadčeledi *Curculionoidea*, kde byla i popsána jako tzv. hmyzí krevní cukr. V pozdějších letech byla její přítomnost potvrzena nejen u dalších skupin hmyzu, ale i u jiných živočichů; trehalóza byla nalezena i v houbách, řasách a bakteriích. Zájem o trehalózu v oblasti hmyzí biochemie vyvolali studie Wyatta a Kalfa (1956) u kukel bourců *Antherea polyphemus* a zároveň i Howdenem a Kilbym (1956) u *Schistocerca gregaria*. Hladiny trehalózy v hemolymfě hmyzu se dramaticky mění v průběhu života organismu podobně jako hladiny glukózy v krvi savců a stejně jako u savců jsou její aktivity modulovány hormonálně. Mellanbyho výzkum (1939) popsal úlohu trehalózy v těle hmyzu jako energetickou rezervu, dnes však víme, že trehalóza je hlavním hmyzím energetickým substrátem. Trehalóza hraje roli také jako hmyzí kryoprotektant.

Hlavní funkcí AKH v hmyzím organismu je především udržení homeostázy organismu a eliminace nebo snížení dopadu stresu na organismus. To je zajištěno aktivitami AKH na dvou úrovních (Gäde a kol., 1997, Gäde a Goldsworthy, 2003; Kodrík, 2008):

- Biochemické aktivity v buňce ovlivňující metabolismus: aktivace cAMP a stimulace lipázy (Spencer a Candy, 1976), stimulace glykogen fosforylázy (Van Marrewijk a kol., 1980), inhibice syntézy lipidů (Gokuldas a kol., 1988), inhibice syntézy RNA (Kodrík a Goldsworthy, 1995), stimulace antioxidantních mechanismů (Kodrík a kol., 2007).
- Fyziologické procesy: stimulace myokardiální aktivity (Scarborough a kol., 1984), zlepšení imunitní odpovědi (Goldsworthy a kol., 2002), regulace chování u hladovějících dospělců *D. melanogaster* (Lee a Park, 2004), pravděpodobná neuromodulační funkce v nervové soustavě hmyzu (Milde a kol., 1995; Kodrík a kol., 2015a), stimulace lokomoční aktivity (Socha a kol., 1999; Kodrík a kol., 2000), stimulace trávicích procesů (Kodrík a kol., 2012, Bodláková a kol., 2018).

1.3.4. Role AKH ve stresu vyvolaném toxiny a patogeny

AKH se svými aktivitami podílí na řízení obranných reakcí na buněčné a molekulární úrovni (Adamo, 2012) proti toxinům, jedům a patogenům. Bylo prokázáno, že AKH se účastní

imunitní odpovědi proti laminarinu (imunogen izolovaný z hnědých řas), lipopolysacharidu (z *Escherichia coli*), bakteriím *Bacillus megaterium* nebo konidiím z houby *Metarhizium anisopliae* (Goldsworthy a kol., 2002, 2003, 2005; Mullen a kol., 2006). Obdobné zapojení AKH do anti-stresové reakce bylo prokázáno u saranče *Schistocerca gregaria* ošetřené insekticidem deltamethrinem (Candy, 2002) a u ploštice *P. apterus* ošetřené permethrinem (Kodrík a Socha, 2005; Kodrík a kol., 2010) nebo endosulfanem a malathionem (Velki a kol., 2011). Souhrnem by se dalo říci, že aplikací toxinů došlo ke zvýšení hladiny AKH v CC i hemolymfě (Kodrík a kol., 2015b). U většiny těchto toxinů však došlo k zajímavému fenoménu, kdy ko-aplikace insekticidu spolu s externím AKH vyvolávala zvýšení účinnosti samotného insekticidu a s tím související zvýšení mortality u ošetřeného hmyzu. To lze vysvětlit tím, že aktivovaný AKH vyvolal zvýšení metabolismu, prokázané zvýšením produkce oxidu uhličitého, a pravděpodobně tak zvýšil i obrat metabolitů včetně toxinů a urychlil tak jejich pronikání do tkání ještě před tím, než se mohly aktivovat vlastní obranné mechanismy.

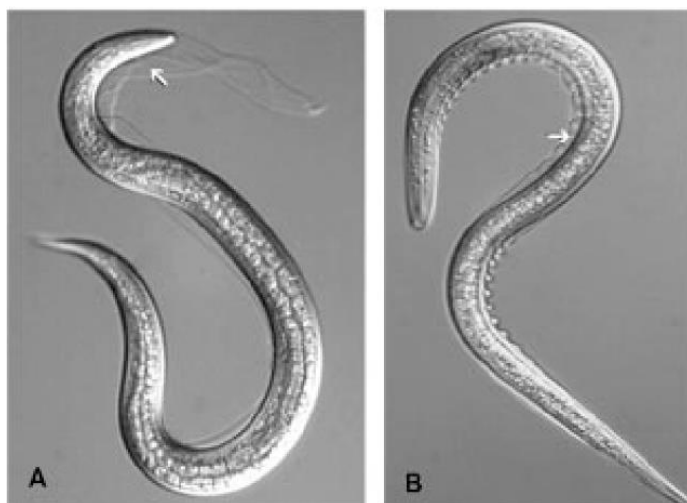
Ve studii provedené Ibrahimem a kol. (2017) byl sledován vliv entomopatogenní hlístice *Steinernema carpocapsae* na fyziologické reakce u *P. apterus*. Také zde se prokázal stimulační účinek AKH na aktivitu hlístic, takže hlístice aplikované spolu s AKH vyvolávaly u pokusných ploštic vyšší mortalitu než hlístice samotné. Podobná reakce byla zaznamenána i u *D. melanogaster* (Ibrahim a kol., 2018). Tento jev autoři objasňují stejnými důvody, jako tomu bylo po aplikaci insekticidů. Ke zvýšené aktivitě hlístic však zřejmě déle přispělo i obohacení hemolymfy ošetřeného hmyzu o živiny mobilizované působením AKH.

V další studii provedené Shaikem a kol. (2017) byl zjišťován vliv AKH na nervosvalovou paralýzu vyvolané aplikací jedu vosičky *Habrobracon hebetor*, kde všechny testované dospělé samice *P. apterus* plně podlehly paralýze po 15 h. Po topikální aplikaci Pyrap-AKH došlo k výraznému zpomalení procesu paralýzy, kde všechny testované samice byly plně paralyzovány až po 20 h, avšak k nejznatelnějšímu rozdílu mezi skupinami Venom-only a Venom+Pyrap-AKH byly v 8 hodině po aplikaci. Rozdíl v paralýze skupiny byl u Venom+Pyrap-AKH 3,2 krát nižší než u skupin aplikovaných samotným jedem. Co se týče zvýšení Pyrap-AKH a Peram-Cah-II exprese v hemolymfě, po 24 h došlo k trojnásobnému zvýšení oproti kontrolní skupině.

1.4. Entomopatogenní hlístice (EPN)

Hlístice, hlístovky nebo nematody jsou mnohobuněční živočichové tvořící samostatný kmen *Nematoda*. Přirozeně se vyskytují na všech kontinentech s výjimkou Antarktidy, kde jejich výskyt ještě nebyl potvrzen. U nematod bylo popsáno celé spektrum potravních specializací, jejichž diverzita přispívá právě k velikosti kmenu *Nematoda* (bakteriofágie, parazitismus apod.). Snad nejznámějším druhem nematod je modelový organismus *Caenorhabditis elegans*, využívaný hojně ve výzkumech vývojové a molekulární biologie.

Hlavní skupiny nematod živící se hmyzem jsou zástupci druhů z čeledí *Heterorhabditidae* a *Steinernatidae* (Obr. 1). Zástupci těchto rodů jsou obligátními parazity. Označení „parazit“ je pro tyto skupiny však nepřesné, jelikož se krmí hlavně odumřelými a rozloženými tkáněmi. U nematod těchto skupin se vyvinul unikátní mutualismus s bakteriemi z čeledi *Enterobacteriaceae*, které nematodám pomáhají zabít hostitele a zároveň jim slouží jako sekundární zdroj potravy.



Obrázek 1: (A) *Steinernema carpocapsae* – infekční juvenil, třetí stádium. Vpravo nahoře je vidět částečně svlečená kutikula. (B) *Heterorhabditis bacteriophora* – začínající svlékání kutikuly (viz šipka) z larvy druhého stádia (Hazir a kol., 2003)

V posledních letech se zájem o EPN v hubení hmyzích škůdců zvýšil hlavně pro jejich hostitelskou specifitu, schopnost přežít relativně dlouhou dobu a nízké náklady na jejich produkci. Pro výzkum jsou proto výbornými stresory vyvolávající infekci nejenom u hmyzu (ale i u koryšů, měkkýšů), díky které lze nahlédnout detailněji do imunitní odpovědi

organismu. Do jaké míry je však smrt hostitele ovlivněna hlísticí a do jaké míry bakterií není u řady druhů přesně známo (Dobeš, 2012).

V dnešní době se pro studium mechanismů obcházející imunitní odpověď hostitele a jejich dopadů na organismus využívá především dvou nematobakteriálních komplexů; *Steinernema-Xenorhabdus* a *Heterorhabditis-Photorhabdus*. Prvně jmenovaný komplex byl použit k experimentům také v této bakalářské práci.

1.4.1. Nematobakteriální komplex *Steinernema-Xenorhabdus*

Steinernema je čeleď EPN se 40 prokázanými zástupci – tito zástupci mají mutualistický neobligátní (nematod může své symbionty zabít) vztah s bakteriemi zástupců z rodu *Xenorhabdus* (Adams a kol., 2006; Herbert a Goodrich-Blair, 2007). Nematody z čeledi *Steinernema* uchovávají své symbiotické bakterie ve specializovaných váčcích na začátku střeva (Martens et Goodrich-Blair, 2005; Snyder a kol., 2007).

1.4.2. Průběh intoxikace entomopatogenními nematody

Životní cyklus nematod *Steinernema* začíná u tzv. *infective juveniles* (IJ), kteří se pohybují volně v půdě, kde čekají na hostitele a aktivně ho vyhledávají. Je to zároveň jediné stádium jejich vývoje vyskytující se mimo hostitele. Strategie vyhledávání hostitele se obvykle popisuje pojmy *cruiser* (vyhledávání je aktivní) a *ambusher*, kdy nematod vyčkává a k napadnutí hostitele dojde při jeho přiblížení (Grewald a kol., 1994). Pro laboratorní experimenty je velice důležité dbát strategií, kterých daný nematod užívá a podle toho uzpůsobit prostředí, kde k infekci dochází (Dobeš, 2012). K samotnému průniku IJ dochází nejčastěji v místech řitě, úst či trachejí hostitele. Dojde k narušení kutikuly, a i přes často vysoký vnitřní tlak hemolymfy a tloušťku kutikuly v trachejích pronikne IJ dovnitř (Bedding a Molyneux, 1982). Po průniku do hostitele EPN vyloučí do dutiny ze svého specializovaného úseku střev symbiotické bakterie, u kterých dojde k masivnímu nárůstu (Martens a Goodrich-Blair, 2005). Mezitím se IJ svléká a přechází do dalšího instaru. Všechna ostatní vývojová stadia probíhají v rozkládajícím se těle hostitele. Po dosažení pohlavní dospělosti samičky kladou vajíčka. Po vyčerpání výživných látek se v těle hostitele začínají kumulovat některé metabolity např. prenol (3-methy-3-buten-1-ol), který má specifický zápach. Jeho přítomnost

informuje jedince v těle hostitele i mimo něj, že zásobní látky byly vyčerpány a je třeba najít dalšího hostitele.

1.4.3. Metabolity a virulence *Steinernema-Xenorhabdus*

Bakterie *Xenorhabdus* jsou pro hmyz obecně velmi patogenní – k usmrcení larev *D. mellonella* stačí pouhých deset až dvacet bakteriálních buněk (Forst a Neelson, 1996; Daborn a kol., 2001). Patogenní jsou i vlastní hlístice, které do těla hostitele vylučují proteázy: proteolytická aktivita bývá často považována za jeden z hlavních faktorů virulence EPN obecně. U druhu *Steinernema carpocapsae* byla zjištěna produkce serinových proteáz a metalloproteáz několik hodin po vstupu do hemoceolu. Např. serinová proteáza Sc-SP-1 hydrolyzuje glykoproteiny fibronektin a laminin a v menší míře i kolagen IV (Toubarro a kol., 2010). Vylučované metalloproteázy mají celý soubor funkcí. Jejich primární funkcí je účast na příjmu potravy a trávicích procesech u nematod, avšak Jing et al (2010) navrhuje také roli v oslabování imunitní odpovědi hostitele. U biologicky čisté *S. carpocapsae* byla zdokumentována schopnost usmrcení hostitele bez symbiotických bakterií a přejít do dalších vývojových stádií, na rozdíl od *H. bacteriophora*.

Inhibice nebo oslabení imunitních odpovědí hmyzího hostitele je nejenom důležité pro přežití EPN, ale zdá se, že hraje i důležitou roli v mutualistickém vztahu s bakteriemi. Podle Götz a kol (1981) jsou EPN schopny mírnit tvorbu antimikrobiálních obranných peptidů hmyzího hostitele nebo navázat hemocyty na svůj povrch a tím tak inhibovat imunitní odpověď jako celek a vytvořit tak optimální podmínky pro bakteriální symbionty.

Řada toxinů produkovaných hlísticemi a jejich bakteriemi byla identifikována. Např. mezi toxiny produkované bak. *Xenorhabdus nematophilus* s prokazatelně insekticidními účinky patří:

- Txp40 napadajícího buňky tukového tělesa a střev hostitele (Brown a kol., 2006).
- Cytotoxin α -xenohabdolysin, který ovlivňuje propustnost cytoplasmatické membrány hemocytů (Ribeiro a kol., 2003).
- 39kDa toxin (Ryu a kol., 2000).
- Intracelulární proteinový komplex Xin (Pan a kol., 2002).
- Lipopolysaccharidy (LPS) jedná se třeba o bakteriální membránový pilin s prokázanou toxickou aktivitou. Jsou sekretovány z vnější strany membrány, a kromě rozkladu

hemocytů inhibují i fenoloxidázy hostitelského organismu (Dunphy, 1994; Brillard a kol., 2001).

Kromě toxinů produkují bakterie *Xenorhabdus* i látky antibakteriálního charakteru k zabránění proliferace kompetujících bakterií.

- Xenorhabdiny – účinné proti Gram-pozitivním druhům (Forst a Nealon, 1996).
- Xenocoucíny – aktivní jako proti Gram-neg/poz druhům bakterií i proti houbám (Park a kol., 2009).
- Indoly – snížení syntézy RNA u Gram-neg/poz bakterií (Sundar a Chang, 1993).

1.4.4. Obrana hmyzu před nematobakteriální infekcí

V předchozích kapitolách byl popsán způsob, kterým se EPN úspěšně dostane do těla hmyzu a dochází ke všem procesům postupně vedoucím k zániku organismu a vzniku nových infekčních juvenilí. Tento proces však pro EPN není vždy tak přímým a popisně jednoduchým. Hmyzí organismus má celou řadu obranných strategií, bariér a účinných chemických zbraní bojující proti svému usmrcení. Jednou z přirozených bariér, kterou musí EPN projít, je překonání střevní stěny hostitele. Střevo se však tomuto procesu brání – vnitřní strana lumenu střeva je tvořena proteoglukany (Eismann a Binnington, 1994), jejichž primární funkcí je obrana střevního epitelu před mechanickým poškozením a případným následným vstupem EPN do buněk střevní stěny. Pod ním se nachází další bariéra – relativně tuhá bazální membrána s kolagenem a lamininem (Olson a kol., 1990).

Překonání této střevní bariéry, je snad jako jediný krok během pronikání EPN do těla hostitele, který je zprostředkován pouze samotnou EPN bez přímé účasti bakterií (Dobeš, 2012). Druh *Steinernema carpocapsae* využívá k překonání této překážky již zmíněnou serinovou proteázu Sc-SP-1, která hydrolyzuje komponenty bazální membrány střeva (Toubarro a kol., 2010). U *Galleria mellanella* dochází působením serinové proteázy ke vzniku fragmentů kolagenu IV, který vyvolá zvýšenou tvorbu lysozymu, antimikrobiálního peptidu gallerimycin, inhibitoru metalloproteáz nebo aktivaci fenoloxidázové imunitní kaskády (Altincicek a kol., 2007).

Entomopatogenní bakterie uvolněné z EPN osídlují 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 (Legueux a kol., 2000).

Jednou ze zajímavých cytotoxických molekul dokumentovaných u *Manduca sexta* po infekci *P. luminescens* byl oxid dusnatý (známý také jako signální molekula; Nappi a kol., 2000; Rivero, 2006). Exprese NO syntázy je stimulována po orálním vniknutí *P. luminescens* do těla hostitele v epitelu jeho střeva, v tukovém tělese a v hemocytech. Bohužel však úloha NO v celém procesu není zdaleka jasná. K aktivaci imunitní odpovědi hmyzího organismu na patogenní infekci dochází také přes signalizaci proteinů vázajících specifické molekuly, které indikující infekci což jsou především peptidoglykany, lipopolysacharidy, a β -1,3-glukany atd. (Yu a kol., 2002; Kim a kol., 2010). Tyto proteinové komplexy pak stimulují intracelulární dráhy jako Toll a Imd aktivující účinné složky imunitní obrany proti parazitickým EPN. Nejčastější způsoby obrany jsou pak fagocytóza, nodulace, enkapsulace atd. (podrobnosti viz Dobeš 2012).

Ačkoliv jsou procesy způsobené EPN ve hmyzím organismu dobře popsány, jejich vztah s neurohormonálním systémem hostitele je dodnes prakticky neprozkoumaná oblast. Proto bylo hlavním záměrem této bakalářské práce studovat vzájemné interakce mezi nematobakteriální nákazou a adipokinetickými hormony u modelového druhu plošnice *P. apterus*.

2. Cíle práce

Mezi hlavní cíle této bakalářské práce patří:

1. Objasnění, zda hladina adipokinetického hormonu kolísá v CNS a corpora cardiaca po aplikaci entomopatogenních nematod.
2. Objasnění, která část CNS bude reagovat pružněji na infekci způsobenou entomopatogenními nematody.

3. Materiály a metody

3.1. Modelový druh hmyzu: ruměnice pospolná, *Pyrrhocoris apterus*

Laboratorní chov plošnice ruměnice pospolné (*P. apterus*) pocházel ze sběrů populace z Českých Budějovic (Stromovka, 49°N). Chov byl udržován při konstantní teplotě 26 ± 1 °C a fotoperiodě krátkého dne (18 hod světla a 6 hod tmy) v 0,5l sklenicích (max. 40 jedinců / sklenice). Plošnice byly krmeny usušenými semeny lípy malolisté a vodou. Čerstvě svlečení dospělci byli následně přemístěni do menších 0,25l sklenic, samci a samice zvlášť, a byli drženi ve stejných podmínkách jako nedospělý jedinci. Pro vyloučení případných fyziologických rozdílů mezi pohlavími byly pro experimenty použity pouze 3-9denní dospělé samice.

3.2. Modelový druh háďátka: *Steinernema carpocapsae*, a vyvolání infekce u ploštic

Pro experimenty bylo použito infekční juvenilní stádium (IJ) hlístice *Steinernema carpocapsae* pocházející původně z Petrohradu (Rusko), udržované v laboratorních podmínkách v posledních larválním instaru zavíječe voskového, *Galleria mellonella* jako v hostiteli (Dr. Mráček – Entomologický ústav, BC AVČR, České Budějovice). IJ jedinci byly z larev zavíječe izolovány a uchovávány v lednici ve vodě při 4 °C vodě nejdéle 30 dní. Jejich životaschopnost byla před experimentem vždy prověřena pod mikroskopem.

V této práci byly použity dva způsoby aplikace EPN k vyvolání infekce u ploštic:

- Topikální aplikace (TOP) EPN

Do 0,25l sklenice byl na dno vložen vystřižený kruh z filtračního papíru, také vnitřní obvod sklenice byl filtračním papírem obložený. Papír byl následně zvlhčen destilovanou vodou, pro co nejsnazší pohyb EPN, a do sklenice byly v příslušném množství přidány pokusné plošnice (zpravidla 25) a suspenze EPN v množství 100 kusů EPN na plošnici (Ibrahim, 2017). Sklenice byly překryty parafilmem, aby se zabránilo vysychání. Parafilm byl ale jehlou na několika místech proděravěn, aby mohlo docházet k výměně plynů a plošnice se neudusili. Kontrolní skupina byla vystavena pouze destilované vodě. Sklenice byly drženy ve stejných teplotních i světelných podmínkách jako základní chovy, a pokusné plošnice měly přístup k potravě i vodě.

Pitva pokusných ploštíc (viz níže) byla po topikální aplikaci prováděna po uplynutí 24, 30 a 48 hodin

- Injekční aplikace (INJ) EPN

Při tomto způsobu infekce byly EPN vpraveny do těla pokusných ploštíc pomocí injekce. Jehla byla vpravena do těla přes abdominálně-metathorakální membránu a EPN v množství 10 kusů na plošnici (Kodrík a kol., v tisku) v objemu 1 μ l injikovány do těla. Ploštice pak byly přemístěny do 0,25l sklenic vystlaných filtračním papírem a udržovány za podmínek uvedených výše.

Pitva pokusných ploštíc (viz níže) byly při injekční aplikaci prováděna po uplynutí 24 hodin

3.3. Testy mortality

Mortalita u pokusných jedinců *P. apterus* vyvolaná působením EPN byla testována po topikální i injekční aplikaci. Pro obě varianty bylo použito 5 – 7 skupin ploštíc vždy s 20 jedinci, kterým byla aplikována příslušná dávka EPN. Výsledky byly odečítány 24 a 48 hodin po infekci a vyjádřeny v procentech uhynulých jedinců.

3.4. Pitva CNS a extrakce adipokinetických hormonů

Pitva CNS ploštice, která zahrnovala mozek spolu se žlázou corpora cardiaca a corpora allata probíhala následujícím způsobem:

1. Hlava spolu s prothoraxem byla odstřižena od zbytku těla a vložena pod binolupu do pitevní misky s Ringerovým fyziologickým roztokem.
2. Za použití entomologických pinzet byl odstraněn prothorax a proudem Ringerova roztoku z pipety vymyty zbytky tukového tělesa. Poté byl z hlavy vyjmut mozek spolu s corpora cardiaca a corpora allata nebo alternativně zvlášť mozek a zvlášť corpora cardiaca. Vypitvané orgány byly následně vloženy do 1,5ml mikrozkuvek s 200 μ l 80 % metanolu, které byly po dobu pitvy dalších jedinců drženy na ledu. Po skončení série pitev byl materiál uložen do mrazáku a držen při -20 °C do dalšího použití.

Pitva CNS plošnice sloužící k imunohistochemii se od výše zmíněného postupu lišila pouze v použití fyziologického roztoku, kdy byl namísto Ringerova roztoku použit fosfátový pufr (PBS); navíc nebylo od komplexu CNS odstraněno corpus allatum.

Extrakce adipokinetických hormonů z tkáně:

1. Vzorky uložené v roztoku metanolu byly podrobeny chlazené homogenizaci pomocí sonikátoru.
2. Takto získaný homogenát byl centrifugován (4 °C, 2 min. při 6000 rpm). Supernatant byl opatrně přepipetován do nově připravených 1,5ml mikrozkušavek.
3. Proces byl opakován ještě jednou pro co nejefektivnější extrakci AKH ze vzorku. Oba supernatanty byly spojeny.
4. Konečný supernatant s objemem 400 μ l byl odpařen ve vakuové centrifuze (Speed Vac) a následně uchován v -20 °C pro další použití.

3.5. Imunohistochemická lokalizace AKH

Ke zjištění regionů produkujících a skladujících AKH bylo využito metody Imunohistochemické lokalizace (IHC). Použitá specifická protilátka byla připravená firmou Sigma Genosys (Cambridge, Velká Británie) proti Pyrap-AKH. Tato protilátka dobře rozeznává nejen Pyrap-AKH, ale i druhý adipokinetický hormon P. apterus Peram-CAH-II (Goldsworthy a kol., 2002b). Jedná se o stejnou protilátku použitou v testu kompetitivní ELISA.

Použité roztoky:

- PBS pufr = 137 mM NaCl, 10 mM Phosphate, 2.7 mM KCl, pH=7.4
- PBT pufr = 0,1 ml TWEEN/100 ml PBS
- Blokovací pufr = 5 % Normální kozí sérum (NGS) v PBT pufru
- 4 % PFA v PBS pufru

Postup práce:

- Po vyjmutí CNS z hlavy plošnice byl vzorek fixován v 4 % PFA po 20-30 minut
- Promývání 3x 500 μ l PBS
- Blokování polyklonálních epitopů za použití 5 % NGS na 2 hodiny při 20 °C
- Aplikace primární Ab/ 5 % NGS 1:200, 3 dny při 4 °C

- Promývání 6x v 500 μ l PBT
- Aplikace sekundární Ab Alexa Fluor® 488/5 % PBT 1:200, přes noc při 4 °C
- Promývání 6x v 500 μ l PBT
- Nanesení CNS na podložní sklíčko a fixace v pryskyřici

Vizualizace pomocí konfokálního mikroskopu a fotografie byly podrobeny úpravě v grafických programech.

3.6. Kvantifikace adipokinetických hormonů pomocí kompetitivního ELISA testu

Ke zjištění celkového množství AKH v CNS *P. apterus* byla použita kompetitivní ELISA podle práce Goldsworthy a kol. (2002b). Stěžejní úlohu v tomto testu hrála specifická protilátka připravená firmou Sigma Genosys (Cambridge, Velká Británie) proti Pyrap-AKH. Jejím použitím lze stanovit celkovou hladinu AKH u plošnice. AKH bylo stanovováno v celkem třech tkáních; CNS (= mozek + corpora cardiaca + corpus allatum), mozek a samotná corpora cardiaca.

Použité roztoky:

- Aplikací pufr = Na_2CO_3 – 0,424 g + NaHCO_3 – 0,504 g na 100 ml, pH=9,6
- Promývací pufr (WB+) = 10 mM PBS (zásobní roztok o složení $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 ředěný 1:9 na pracovní roztok) + 0,1 ml Tween/100 ml WB, pH=7,5
- Promývací pufr bez Tweenu (WB-)
- BLAM = roztok Cys¹ – Pyrap-AKH – BLAM značeného biotinem (**B**iotin **L**ong **A**rm **M**aleimide; Vector Laboratories, Petebrough, UK)
- 0.5 M H_2SO_4

Postup práce:

1. Aplikace IgG protilátky při 4 °C přes noc v množství 100 μ l/jamka – ředění 1:10 000 ve vyvíjecím pufru
2. Promývání 3x 200 μ l WB+
3. Blokování v 5 % mléku v WB+ po 2 hodiny při 37 °C – 200 μ l/jamka
4. Promývání 3x 200 μ l WB+

5. Aplikace antigenu rozpuštěného ve WB- – 50µl roztoku antigenu + 50µl (100 fmol) BLAM/ jamku a inkubace 1 hodinu při 37 °C
6. Promývání 3x 200µl WB+
7. Aplikace HRPS (Horse Radish Peroxidase) - 100µl/jamka 1 hodinu při 37 °C – ředění 1:500 v WB+
8. Promývání 6x 200µl WB+
9. Aplikace 3, 3', 5, 5' – tetrametylbenzediene a inkubace 40 minut ve tmě při 37 °C
10. Zastavení reakce přidáním 50µl 0,5 M H₂SO₄/jamku
11. Měření absorbance při 450 nm v přístroji *ELISA reader*
12. Výpočet procenta kompetice z naměřených hodnot podle vzorce:

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

13. Sestrojení kalibrační křivky ze známých dávek syntetického standardu Pyrap-AKH a určení množství AKH v měřených vzorcích

3.7. Zpracování výsledků

Výsledky byly zpracovány pomocí programu Microsoft Excel 2016 a grafy byly vypracovány za použití grafického programu Prism (GraphPad Software, verze 6.0, San Diego, CA, USA). Sloupcové grady reprezentují průměr ± standardní odchylku. Statisticky prokazatelné rozdíly (5 % hladina významnosti) byly vypočítány pomocí Studentova t-testu v programu Prism.

Pro experimenty byly použity dvě skupiny vzorků:

1. Kontrolní skupina – skupina bez aplikace EPN
2. Skupiny s EPN – skupina ošetřená příslušným množstvím EPN na jedince.

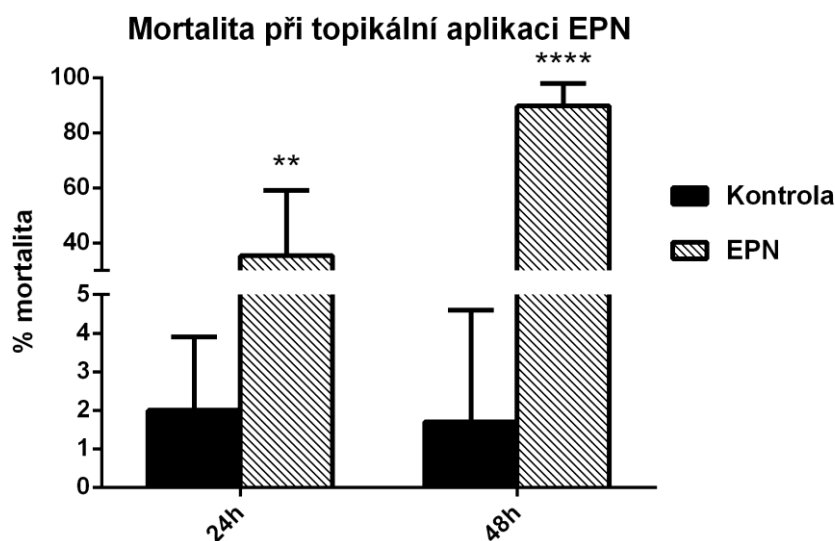
Počet opakování pro každou skupinu n=4-8.

Pro analýzu imunohistochemických snímků z konfokálního mikroskopu bylo použito programu Photoshop (Adobe software, verze 6.0, San Jose, California, US) a Imaris Bitplane (Andor Technology plc., 2009, Concord, MA, USA).

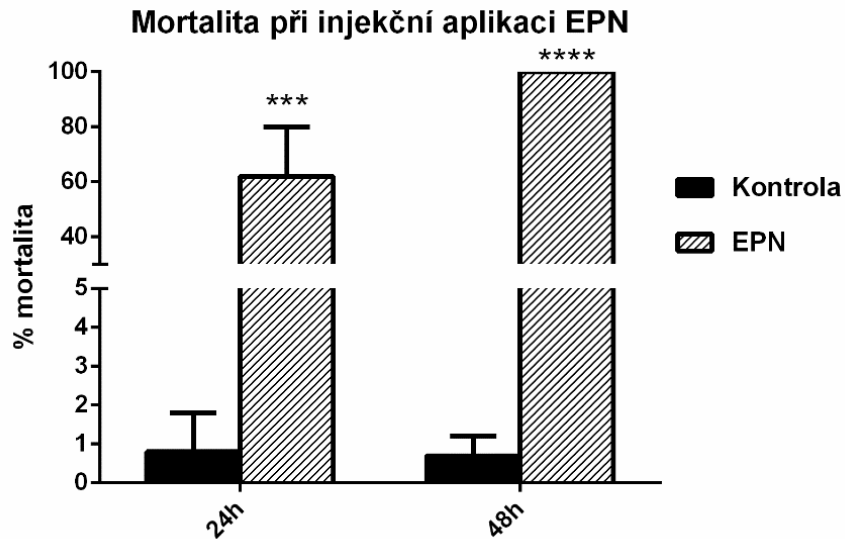
4. Výsledky

4.1. Vliv infekce entomopatogenními nematody na mortalitu

Výsledky první série pokusů ukázaly, že aplikace EPN na dospělé samice *P. apterus* vyvolá dramatický nárůst mortality. U topikální aplikace EPN (Obr. 2) bylo zaznamenáno 18 násobné zvýšení mortality vůči kontrole po 24 hodinách a 50 násobné po 48 hodinách. Podobně u injekční aplikace EPN (Obr. 3) bylo navýšení mortality 67 násobné po 24 hodinách a 125 násobné po 48 hodinách. U všech kombinací byl nárůst mortality statisticky významný.



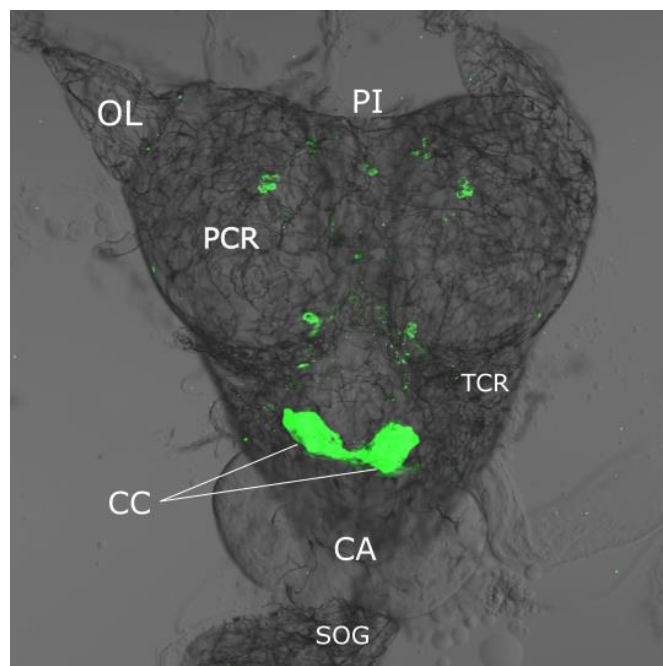
Obrázek 2: Mortalita 4-9 denních samic *P. apterus* 24 a 48 hodin po topikální aplikaci 100 EPN na jedince. Statisticky průkazný rozdíl mezi infikovanou a kontrolní skupinou testovaný Studentovým t-testem je označen ** (1% hladina významnosti) a **** (0,01 % hladina významnosti (n=7)).



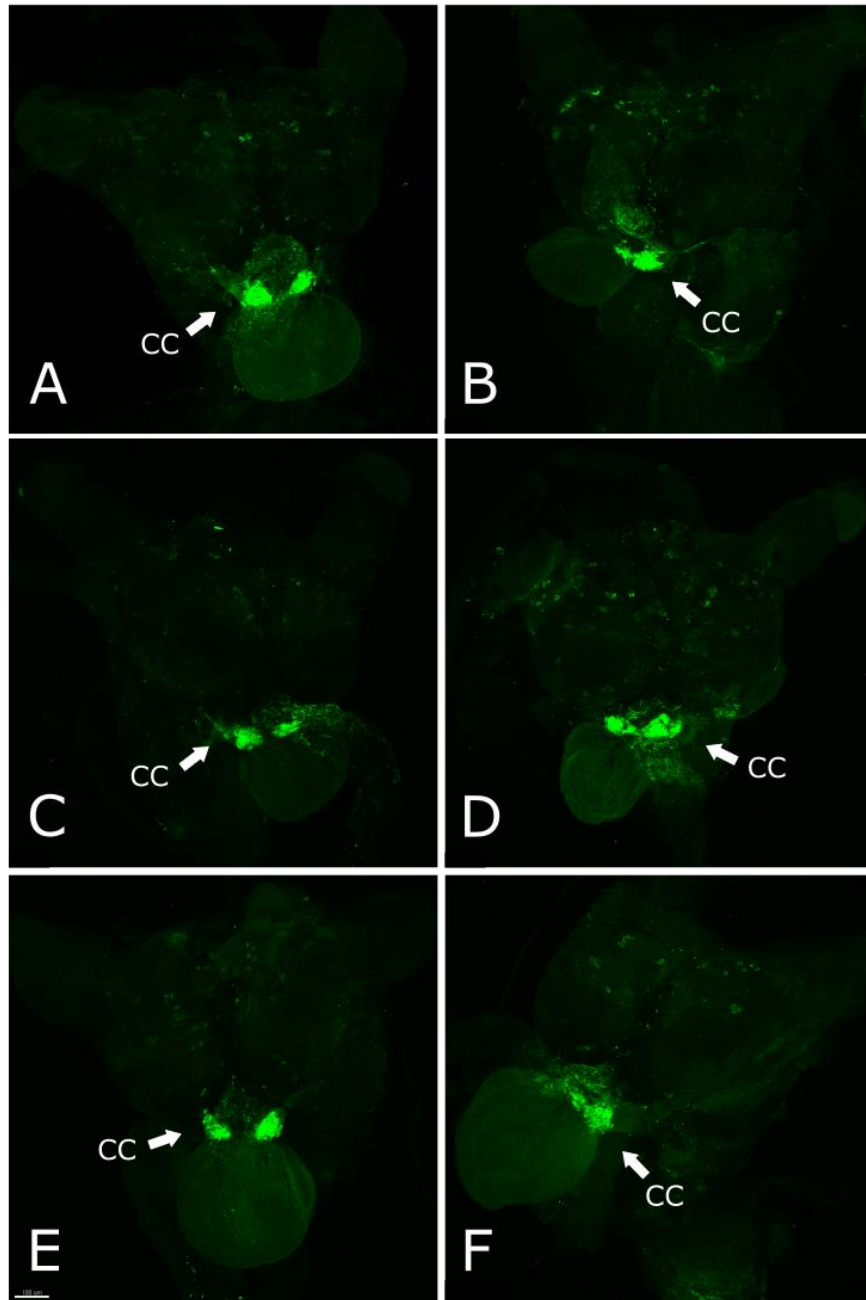
Obrázek 3: Porovnání mortality u skupin 4-9denních samic *P. apterus* s injekční aplikací 10 EPN na jedince. Statisticky průkazný rozdíl mezi infikovanou a kontrolní skupinou testovaný Studentovým t-testem je označen *** (0,1% hladina významnosti) a **** (0,01 % hladina významnosti (n=7)).

4.2. Imunohistochemická lokalizace AKH v centrální nervové soustavě

Výsledky imunohistochemické analýzy jednoznačně prokázaly přítomnost imunoreaktivního materiálu AKH v párových endokrinních žlázách corpora cardiaca i v samotném mozku (Obr. 4). V mozku byl signál senzorkou analýzou prokázán v přibližně 20 neuronech lokalizovaných především při střední ose protocerebra. Aplikace EPN na pokusné plošnice nicméně nevyvolala viditelné změny imunoreaktivity v CNS, proto bylo přistoupeno ke kvantifikaci hladin AKH pomocí ELISA testů.



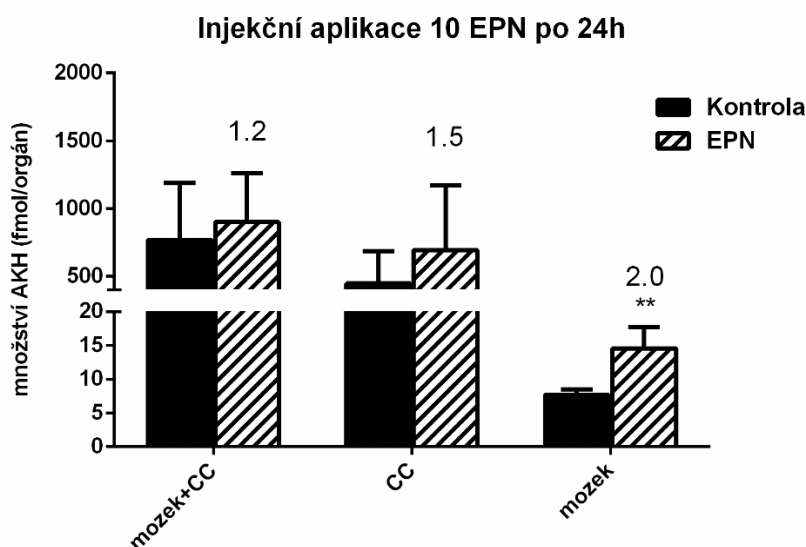
Obrázek 4: Centrální nervová soustava 4-denní samice *P. apterus*. Zelená barva označuje pozitivní reakci s Ab proti Pyrap-AKH (podrobnosti viz Materiál a metodika). CA – corpora allata, CC – corpora cardiaca, OL – optický lalok, PCR – protocerebrum, PI – pars intercerebralis, SOG – suboesofageální ganglion, TCR – tritocerebrum.



Obrázek 5: Centrální nervová soustava 4-9 denních samic *P. apterus*. Zelená barva označuje pozitivní reakci s Ab proti Pyrap-AKH (podrobnosti viz Materiál a metodika). A – injekční aplikace EPN pitva za 24 hod; B – kontrola k A; C – topikální aplikace EPN pitva za 24 hod; D – kontrola k C; E – topikální aplikace EPN pitva za 48 hod, F – kontrola k E.

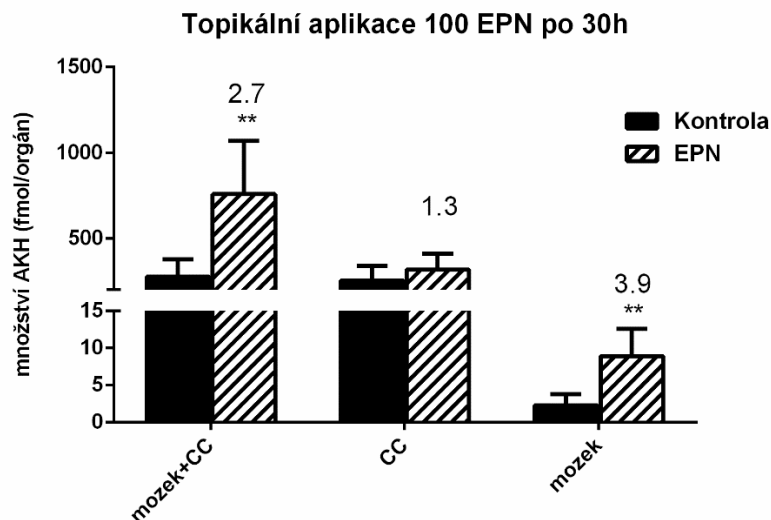
4.3. Kvantitativní stanovení AKH v centrální nervové soustavě

Injekční aplikace EPN do samic *P. apterus* vyvolala nárůst hladiny AKH u všech sledovaných orgánů (Obr. 6), přestože většina materiálu – 98,4 % - byla soustředěna v CC. Nárůst AKH v mozku + CC byl 1,2 násobný a v samotných CC 1,5 násobný, nicméně toto zvýšení nebylo statisticky průkazné. K největšímu, dvojnásobnému, a také statisticky průkaznému zvýšení hladiny AKH došlo v samotném mozku.



Obrázek 6: Hladina AKH u 4-9 denních samic *P. apterus* 24 hod po injekční aplikaci 10 EPN. Čísla nad EPN sloupci označují navýšení hladiny AKH vůči příslušné kontrole. Statisticky průkazný rozdíl mezi infikovanými a kontrolními skupinou testovaný Studentovým t-testem je označen ** (1% hladina významnosti) (n=6).

Také topikální aplikace EPN na samice *P. apterus* vyvolala nárůst množství AKH u všech sledovaných částí CNS (Obr. 7). Nárůst AKH v mozku+CC byl 2,7 násobný a v samotných CC 1,3 násobný, nicméně zvýšení v CC nebylo statisticky průkazné. K největšímu, 3,9 násobnému, a také statisticky průkaznému zvýšení hladiny AKH došlo v samotném mozku.



Obrázek 7: Hladina AKH u 4-9 denních samic *P. apterus* 30 hod po topikální aplikaci 100 EPN. Čísla nad EPN sloupci označují navýšení hladiny AKH vůči příslušné kontrole. Statisticky průkazný rozdíl mezi infikovanými a kontrolními skupinou testovaný Studentovým t-testem je označen ** (1% hladina významnosti) (n=5).

5. Diskuze

Není překvapivé, že aplikace EPN na plošnice *P. apterus* vyvolala dramatické zvýšení jejich mortality. Pro provádění vlastních pokusů však bylo nutné stanovit vhodnou dávku EPN, která by vyvolala v ploštících významný stres, ale nezpůsobila příliš velkou mortalitu: na veškeré analýzy prováděné v této práci byli použiti pouze živý jedinci. K vytipování vhodných dávek EPN jsem vycházel z prací Ibrahima a kol. (2017) a Kodríka a kol. (v tisku). Mortalita pozorovaná při topikální aplikaci 100 jedinců EPN dosahovala v práci Ibrahima a kol. (2017) za 24 h v průměru 20 % a za 48 h v průměru 70 %. To se částečně lišilo od mých údajů (viz Obr. 2), kde jsem ve stejně uspořádaném pokusu zjistil mortalitu 35 % resp. 90 %. Důvod, kterým by bylo možné vysvětlit rozdíl mezi těmito údaji a výsledky této práce se skrývá v EPN samotných, protože jejich toxicita se mění podle stáří. To je také jeden z důvodů, proč je nutno provádět stanovení mortality před každou sérií experimentů. Jak je uvedeno výše, pro tuto práci bylo použito týden starých infekčních juvenilů (IJ) z hostitele *Galleria mellonella*. Podobné kolísání účinnosti hlístic je uvedeno ve studii Lua a kol. (2017), kde autoři infikovali cvrčky *Acheta domesticus* entomopatogenní hlísticí *Steinernema scapterisci* a zdokumentovali pokles toxicity s prodlužující se dobou od jejich extrakce z hostitelského organismu. Injekční

aplikace 10 EPN na plošnici, kterou jsem použil v této práci, vyvolala v průměru 60 % mortalitu po 24 h a dokonce 100 % mortalitu po 48 h. Průběžné pozorování během 24-48 h navíc prokázalo, že k úhynu všech jedinců dochází již po uplynutí 32 hodin.

Místem, kde dochází k nejvýraznější produkci, uchovávání a vylučování AKH v hmyzím organismu je jednoznačně endokrinní žláza corpora cardiaca (Gäde a kol., 1997; Nässel a Winther, 2010). Snímky pořízené na konfokálním mikroskopu v rámci mé bakalářské práce tento fakt potvrzují (viz Obr. 5). Nicméně z mých výsledků je také patrné, že AKH se u *P. apterus* vyskytuje také v samotném mozku. Tyto výsledky navazují na předchozí studie naší laboratoře uvedené v pracích Kodříka a kol. (2003, 2015a), kde byla přítomnost AKH v mozku ploštic poprvé prokázána - nejvíce AKH pozitivních buněk bylo zdokumentováno v protocerebru a bylo rovněž prokázáno, že v mozku dochází i k expresi AKH. Podobné výsledky ohledně lokalizace AKH produkujících neuronů jsou patrné i v mé práci (viz Obr. 5). Fenomén, přítomnosti AKH nejenom v CC ale i v mozku, byl zdokumentován již v předešlých studiích u druhů *Locusta migratoria* (Schooneveld a kol., 1985; Moshitzky a kol., 1987a; Bray a kol., 1993), *Carausius morosus* (Clottens a kol., 1987) nebo *Aedes aegypti* (Kaufmann a kol., 2009). První práce potvrzující přítomnost AKH v jiných částech CNS nežli jen v CC, byla vypracována na *Locusta migratoria*, kde s použitím značeného Locmi-AKH [5-³H] tryptofanem bylo *in vitro* prokázáno, že AKH syntetizující se v CC nemigruje do mozkových buněk (Schooneveld a kol., 1983, 1985; Bray a kol., 1993). Naproti tomu u některých hmyzích druhů zřejmě k produkci AKH v neurosekretorických buňkách mozku nedochází. Příkladem takového druhu je *Drosophila*, kde k syntéze AKH dochází pouze v buňkách CC, které jsou jak známo u vyšších Dipter součástí kruhové žlázy (Kim and Rulifson, 2004; Lee and Park, 2004; Isabel a kol., 2005; Nässel and Winther, 2010).

Množství AKH, které obsahují CC společně s mozkiem, kolísá, je-li organismus vystaven stresu (Candy, 2002; Kodřík a kol., 2015ab). Míra kolísání je způsobena typem a intenzitou stresu a je také druhově rozdílná. Například aplikace 50 ng insekticidu permethrinu (Kodřík a Socha, 2005; Kodřík a kol., 2010) vyvolala u *P. apterus* asi 3.3 násobné zvýšení hladiny AKH v CNS. Dalším příkladem je i aplikace řady různých toxinů, která vyvolala u pokusných jedinců několika násobné navýšení hladin AKH v CNS i hemolymfě (viz souhrnná práce Kodřík a kol., 2015b).

Z mých pokusů vyplynulo, že injekční aplikace EPN vyvolala pouze malé navýšení hladiny AKH v CC a významné navýšení hladiny v mozku, přestože v CC je soustředěna převážná

část zásob AKH. Podobně tomu bylo i v případě topikální aplikace, i když zde bylo zaznamenáno významné navýšení hladiny AKH i v komplexu CC+mozek, jeho intenzita však byla nižší než v samotném mozku. Podobné výsledky byly zaznamenány v práci Kodrůka a kol. (2015b), kde byl stres vyvolán osmotickým šokem po aplikaci KCl. Autoři zde zjistili, mnohem výraznější nárůst hladiny AKH v mozku (asi 7 násobný), než v CC (asi 1,2 násobný). Ze všech těchto výsledků je zřejmé, že úloha AKH v mozku bude zřejmě odlišná od převážně metabolických funkcí AKH, které jsou řízeny uvolňováním relativně velkých zásob AKH v CC. Přesný charakter této funkce není znám, ale předpokládá se, že se AKH uplatňuje v nervové signalizaci jako neuromediátor. Aplikace hád'átek do těla ploštic jistě vyvolá intenzivní anti-stresovou odpověď, které se účastní i nervová soustava; nutnost navýšit hladinu mediátorů při tomto procesu se jeví jako logický důsledek. Tyto závěry jsou v souladu s výsledky dřívějších pokusů, kdy Milde a kol. (1995) zjistili, že injekce AKH do mesothotakálního ganglia vyvolala zvýšenou elektrickou aktivitu u příslušných svalů. I další studie (Wicher a kol., 2006) zdokumentovala navýšení neuronální aktivity u švába *P. americana* po aplikaci AKH. Z tohoto hlediska výsledky mé bakalářské práce zapadají do celkových poznatků o možné roli AKH v mozku.

Studium adipokinetických hormonů se v posledních letech zaměřovalo také na jejich možné praktické využití třeba v kontrole populací hmyzích škůdců (Gäde a Goldsworthy, 2003; Kodrůk a kol., 2015c) nebo možná i veterinární či dokonce humánní praxi, kdy se uvažuje o potencionálním využití jejich anti-obézních (Gáliková a kol., 2017) nebo neuroprotektivních (Mutlu a kol., 2018; Shaik a kol., 2017) účinků. Proto jsou jakékoliv údaje o tomto hormonu, které pomáhají pochopit jeho funkce, včetně těch v mozku, velmi cenné.

6. Závěr

Výsledky této práce zabývající se změnami hladin AKH v CNS *P. apterus* po vyvolání stresu aplikací hlístice *Steinernema carpocapsae* prokázaly:

- Přítomnost adipokinetického hormonu v corpora cardiaca i mozkových neuronech v centrální nervové soustavě *P. apterus*.
- Mnohonásobně vyšší hladinu AKH v corpora cardiaca než v mozku
- Změny hladin AKH v CNS po infekci, přičemž změny v mozku jsou větší než v CC.

7. Seznam citované literatury

- Adamo, S. A. (2012). The effects of the stress response on immune function in invertebrates: An evolutionary perspective on an ancient connection. *Hormones and Behavior*, 62(3), 324–330. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2012.02.012>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2016.10.003>
- 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” [Biol. Control 37 (2006) 32-49]. *Biological Control*, 38(1), 4–21. [https://doi.org/10.1016/S1049-9644\(06\)00126-5](https://doi.org/10.1016/S1049-9644(06)00126-5)
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2008.11.007>
- Altincicek, B., Linder, M., Linder, D., Preissner, K. T., & Vilcinskas, A. (2007). Microbial metalloproteinases mediate sensing of invading pathogens and activate innate immune responses in the lepidopteran model host *Galleria mellonella*. *Infection and Immunity*, 75(1), 175–183. <https://doi.org/10.1128/IAI.01385-06>
- Bassetti, M. (1995). Degradation of gonadotropin beta-subunits retained in the endoplasmic reticulum of the gonadotropes of castrated rats. *Endocrinology*, 136(3), 1168–1176. <https://doi.org/10.1210/en.136.3.1168>
- Bedding, R. A., & Molyneux, A. S. (1982). Penetration of insect cuticle by infective juveniles of heterorhabditis SPP. (Heterorhabditidae: Nematoda). *Nematologica*, 28(3), 354–359. <https://doi.org/10.1163/187529282X00402>
- BodlÁková, K., Beňová, M., & Kodrík, D. (2018). The effect of adipokinetic hormones on the activity of digestive enzymes. *Physiological Entomology*, 43(2), 140–148. <https://doi.org/10.1111/phen.12238>
- Bray, M. M., Shafi, S., Wheeler, C. H., & Goldsworthy, G. J. (1993). Quantification by

- radioimmunoassay of adipokinetic hormone-I in neural tissues in the head of *Locusta migratoria*. *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part A: Physiology*, 106(2), 257–262. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(93\)90509-3](https://doi.org/10.1016/0300-9629(93)90509-3)
- Brillard, J., Ribeiro, C., Boemare, N., Brehélin, M., & Givaudan, A. (2001). Two Distinct Hemolytic Activities in *Xenorhabdus nematophila* are Active against Immunocompetent Insect Cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(6), 2515–2525. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.6.2515-2525.2001>
- 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. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.2.1653-1662.2006>
- 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. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(02\)00056-5](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(02)00056-5)
- Clottens, F., Gäde, G., Huybrechts, R., & De Loof, A. (1989). Immunohistochemical localisation of the hypertrehalosaemic hormone II (Cam-HrTH-II) and related peptides in the nervous system of *Carausius morosus* and *Sarcophaga bullata*. *Cell and Tissue Research*, 258(3), 631–636. <https://doi.org/10.1007/BF00218876>
- Comley, R., Lightfoot, M., & Goldsworthy, G. J. (2002). *A quantitative study of adipokinetic hormone of the firebug, Pyrrhocoris apterus - Birkbeck ePrints*. 48, 1103–1109. Retrieved from <http://eprints.bbk.ac.uk/241/>
- 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. <https://doi.org/10.1128/JB.183.20.5834-5839.2001>
- Diederer, J. H. B., Oudejans, R. C. H. M., Harthoorn, L. F., & Van Der Horst, D. J. (2002). Cell biology of the adipokinetic hormone-producing neurosecretory cells in the locust *corpus cardiacum*. *Microscopy Research and Technique*, 56(3), 227–236. <https://doi.org/10.1002/jemt.10026>
- 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.
<https://doi.org/10.4161/fly.19553>
- Downer, R. G. H. (1979). Induction of hypertrehalosemia by excitation in *Periplaneta americana*. *Journal of Insect Physiology*, 25(1), 59–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(79\)90037-4](https://doi.org/10.1016/0022-1910(79)90037-4)
- Dunphy, G. B., & Downer, R. G. H. (1994). Octopamine, a modulator of the haemocytic nodulation response of non-immune *Galleria mellonella* larvae. *Journal of Insect Physiology*, 40(3), 267–272. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(94\)90050-7](https://doi.org/10.1016/0022-1910(94)90050-7)
- 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. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(94\)90055-8](https://doi.org/10.1016/0020-7519(94)90055-8)
- Forst, S., & Nealson, K. (1996). Molecular Biology of the Symbiotic-Pathogenic Bacteria Spp, *Xenorhabdus* spp *Photorhabdus*. *Microbiological Reviews*, 60(1), 21–43.
- Gäde, G., & Auerswald, L. (2002). Beetles' choice - Proline for energy output: Control by AKHs. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 132, 117–129.
- Gäde, G. (1997). The explosion of structural information on insect neuropeptides. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, 1–128.
- Gäde, G., & Auerswald, L. (2003). Mode of action of neuropeptides from the adipokinetic hormone family. *General and Comparative Endocrinology*, 132(1), 10–20. [https://doi.org/10.1016/S0016-6480\(03\)00159-X](https://doi.org/10.1016/S0016-6480(03)00159-X)
- 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. <https://doi.org/10.1002/ps.755>
- 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. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201600138>
- Gokuldas, M., Hunt, P. A., & CANDY, D. J. (1988). The inhibition of lipid synthesis in vitro

- in the locust, *Schistocerca gregaria*, by factors from the corpora cardiaca. *Physiological Entomology*, *13*(1), 43–48. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.1988.tb00907.x>
- 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. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(03\)00118-5](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(03)00118-5)
- 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. <https://doi.org/10.1196/annals.1327.013>
- 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. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(02\)00085-9](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(02)00085-9)
- Gotz, P., Boman, A., & Boman, H. G. (2006). Interactions between insect immunity and an insect-pathogenic nematode with symbiotic bacteria. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, *272*(1188), 333–350. <https://doi.org/10.1098/rspb.1981.0043>
- 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. <https://doi.org/10.1017/S003118200006830X>
- Hazir, S., Kaya, H. K., Stock, P., & Keskin, N. (2003). Introduction. *Turkish Journal of Biology*, *27*(2003), 181–202. Retrieved from <http://journals.tubitak.gov.tr/biology/issues/biy-03-27-4/biy-27-4-1-0401-1.pdf>
- Herbert, E. E., & Goodrich-Blair, H. (2007). Friend and foe: The two faces of xenorhabdus nematophila. *Nature Reviews Microbiology*, *5*(8), 634–646. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1706>
- Howden, G. F., & Kilby, B. A. (1956). Trehalose and trehalase in the locust. *CHEMISTRY & INDUSTRY*, (48), 1453-1454.
- Chapman, R.F.(1998).*The Insects: Structure and Function*, 4th ed.,Cambridge university press, Cambridge

- 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. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2018.04.002>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2017.02.009>
- Isabel, G., Martin, J.-R., Chidami, S., Veenstra, J. A., & Rosay, P. (2005). AKH-producing neuroendocrine cell ablation decreases trehalose and induces behavioral changes in *Drosophila*. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *288*(2), R531–R538. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00158.2004>
- Kaufmann, C., & Brown, M. R. (2006). Adipokinetic hormones in the African malaria mosquito, *Anopheles gambiae*: Identification and expression of genes for two peptides and a putative receptor. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *36*(6), 466–481. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2006.03.009>
- Kaufmann, C., Merzendorfer, H., & Gäde, G. (2009). The adipokinetic hormone system in Culicinae (Diptera: Culicidae): Molecular identification and characterization of two adipokinetic hormone (AKH) precursors from *Aedes aegypti* and *Culex pipiens* and two putative AKH receptor variants from *A. aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *39*(11), 770–781. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2009.09.002>
- Kim, C. H., Shin, Y. P., Noh, M. Y., Jo, Y. H., Han, Y. S., Seong, Y. S., & Lee, I. H. (2010). An Insect Multiligand Recognition Protein Functions as an Opsonin for the Phagocytosis of Microorganisms. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(33), 25243–25250. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.134940>
- Kim, S. K., & Rulifson, E. J. (2004). Conserved mechanisms of glucose sensing and regulation by *Drosophila corpora cardiaca* cells. *Nature*, *431*(7006), 316–320. <https://doi.org/10.1038/nature02897>
- Kodrík, D., Bártů, I., & Socha, R. (2009). Adipokinetic hormone (Pyrap-AKH) enhances the effect of a pyrethroid insecticide against the firebug *Pyrrhocoris apterus*. *Pest Management Science*, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/ps.1894>
- Kodrík, D., Socha, R., & Syrová, Z. (2003). Developmental and diel changes of adipokinetic

- hormone in CNS and haemolymph of the flightless wing-polymorphic bug, *Pyrrhocoris apterus* (L.). *Journal of Insect Physiology*, 49(1), 53–61. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(02\)00245-7](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(02)00245-7)
- Kodrík, D., Socha, R., & Zemek, R. (2002). Topical application of Pya-AKH stimulates lipid mobilization and locomotion in the flightless bug, *Pyrrhocoris apterus* (L.) (Heteroptera). *Physiological Entomology*, 27(1), 15–20. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3032.2002.00261.x>
- Kodřík, Dalibor. (2008). Adipokinetic hormone functions that are not associated with insect flight. *Physiological Entomology*, 33(3), 171–180. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.2008.00625.x>
- Kodřík, Dalibor, Bártů, I., & Socha, R. (2010). Adipokinetic hormone (Pyrp-AKH) enhances the effect of a pyrethroid insecticide against the firebug *Pyrrhocoris apterus*. *Pest Management Science*, 66(4), 425–431. <https://doi.org/10.1002/ps.1894>
- Kodřík, 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. <https://doi.org/10.3390/ijms161025788>
- Kodřík, Dalibor, & Goldsworthy, G. J. (1995). Inhibition of RNA synthesis by adipokinetic hormones and brain factor(s) in adult fat body of *Locusta migratoria*. *Journal of Insect Physiology*, 41(2), 127–133. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(94\)00096-Y](https://doi.org/10.1016/0022-1910(94)00096-Y)
- Kodřík, Dalibor, Krishnan, N., & Habušťová, O. (2007). Is the titer of adipokinetic peptides in *Leptinotarsa decemlineata* fed on genetically modified potatoes increased by oxidative stress? *Peptides*, 28(5), 974–980. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2007.01.017>
- Kodřík, Dalibor, & Socha, R. (2005). The effect of insecticide on adipokinetic hormone titre in the insect body. *Pest Management Science*, 61(11), 1077–1082. <https://doi.org/10.1002/ps.1087>
- Kodřík, 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. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.10.014>

- Kodrík, Dalibor, 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(1), 194–204. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.11.010>
- 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(6), 489–498. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(00\)00025-4](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(00)00025-4)
- Kodrík D., Ibrahim E., Gautam U.K., Čapková-Frydrychová R., Bednářová A., Křišťůfek V. and Jedlička P. Changes in vitellogenin expression caused by nematodal and fungal infections in insects. *Journal of Experimental Biology*
- Köllisch, G. V., Lorenz, M. W., Kellner, R., Verhaert, P. D., & Hoffmann, K. H. (2000). Structure elucidation and biological activity of an unusual adipokinetic hormone from corpora cardiaca of the butterfly, *Vanessa cardui*. *European Journal of Biochemistry*, 267(17), 5502–5508. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01611.x>
- 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.21.11427>
- Lee, G., & Park, J. H. (2004). Hemolymph Sugar Homeostasis and Starvation-Induced Hyperactivity Affected by Genetic Manipulations of the Adipokinetic Hormone-Encoding Gene in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 167(1), 311–323. <https://doi.org/10.1534/genetics.167.1.311>
- 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. In *PLoS Pathogens* (Vol. 13). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006302>
- Maquenne, L. (1891). Recherches sur la trehalose. *Comptes Rendus de l'Académie Des Sciences*, 112(947).

- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00585.x>
- Mellanby, K. (1939). Low temperature and insect activity. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B - Biological Sciences*, 127(849), 473–487. <https://doi.org/10.1098/rspb.1939.0035>
- 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. Retrieved from <http://jeb.biologists.org/content/198/6/1307.abstract>
- Moshitzky, P., Henzel, W. J., Rafaeli, A., Ramachandran, J., & Applebaum, S. W. (1987). Synthesis of adipokinetic hormone (AKH-I) in the locust brain. *Insect Biochemistry*, 17(8), 1133–1137. [https://doi.org/10.1016/0020-1790\(87\)90084-9](https://doi.org/10.1016/0020-1790(87)90084-9)
- Mullen, L. M., & Goldsworthy, G. J. (2006). Immune responses of locusts to challenge with the pathogenic fungus *Metarhizium* or high doses of laminarin. *Journal of Insect Physiology*, 52(4), 389–398. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2005.10.008>
- Mutlu, O., Páleníček, T., Pinterová, N., Šichová, 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. <https://doi.org/10.1111/fcp.12386>
- Nappi, A. J., Vass, E., Frey, F., & Carton, Y. (2000). Nitric Oxide Involvement in *Drosophila* Immunity. *Nitric Oxide*, 4(4), 423–430. <https://doi.org/10.1006/niox.2000.0294>
- Nässel, D. R. (2002). Neuropeptides in the nervous system of *Drosophila* and other insects: multiple roles as neuromodulators and neurohormones. *Progress in Neurobiology*, 68(1), 1–84. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(02\)00057-6](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(02)00057-6)
- Nässel, D. R., & Winther, Å. M. E. (2010). *Drosophila* neuropeptides in regulation of physiology and behavior. *Progress in Neurobiology*, 92(1), 42–104. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2010.04.010>
- Noyes, B. E., Katz, F. N., & Schaffer, M. H. (1995). Identification and expression of the

- Drosophila* adipokinetic hormone gene. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 109(2), 133–141. [https://doi.org/10.1016/0303-7207\(95\)03492-P](https://doi.org/10.1016/0303-7207(95)03492-P)
- 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. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb08229.x>
- Pan Yinghong , JIAN Heng , ZHANG Jie , LIU Zheng, CHEN Zhongyi , YANG Xiufen, Y. H. and H. D. (2002). An intracellular toxic protein (Xin) isolated from *Xenorhabdus nematophilus* strain BJ. *Progress in Natural Science*, 12(4), 310–312.
- Park, D., Ciezki, K., van der Hoeven, R., Singh, S., Reimer, D., Bode, H. B., & Forst, S. (2009). Genetic analysis of xenocoumacin antibiotic production in the mutualistic bacterium *Xenorhabdus nematophila*. *Molecular Microbiology*, 73(5), 938–949. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06817.x>
- Park, Y., Kim, Y.-J., & Adams, M. E. (2002). Identification of G protein-coupled receptors for *Drosophila* PRXamide peptides, CCAP, corazonin, and AKH supports a theory of ligand-receptor coevolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(17), 11423–11428. <https://doi.org/10.1073/pnas.162276199>
- Ribeiro, C., Vignes, M., & Brehélin, M. (2003). *Xenorhabdus nematophila* (Enterobacteriaceae) Secretes a Cation-selective Calcium-independent Porin Which Causes Vacuolation of the Rough Endoplasmic Reticulum and Cell Lysis. *Journal of Biological Chemistry*, 278(5), 3030–3039. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210353200>
- Rivero, A. (2006). Nitric oxide: an antiparasitic molecule of invertebrates. *Trends in Parasitology*, 22(5), 219–225. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.02.014>
- Ryu, K. G., Bae, J. S., Yu, Y. S., & Park, S. H. (2000). Insecticidal toxin from *Xenorhabdus nematophilus*, symbiotic bacterium associated with entomopathogenic nematode *Steinernema glaseri*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 5(2), 141–145. <https://doi.org/10.1007/BF02931886>
- Scarborough, R. M., Jamieson, G. C., Kalish, F., Kramer, S. J., McEnroe, G. A., Miller, C. A., & Schooley, D. A. (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 Sciences*, 81(17), 5575–5579.

<https://doi.org/10.1073/pnas.81.17.5575>

- Schooneveld, H., Romberg-Privee, H. M., & Veenstra, J. A. (1985). Adipokinetic hormone-immunoreactive peptide in the endocrine and central nervous system of several insect species: A comparative immunocytochemical approach. *General and Comparative Endocrinology*, *57*(2), 184–194. [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(85\)90262-X](https://doi.org/10.1016/0016-6480(85)90262-X)
- Schooneveld, H., Tesser, G. I., Veenstra, J. A., & Romberg-Privee, H. M. (1983). Adipokinetic hormone and AKH-like peptide demonstrated in the corpora cardiaca and nervous system of *Locusta migratoria* by immunocytochemistry. *Cell and Tissue Research*, *230*(1). <https://doi.org/10.1007/BF00216028>
- Shaik, H. A., Mishra, A., & Kodr k, 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. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2017.02.011>
- Sicard, M., Ferdy, J.-B., Pag s, 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. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2004.00748.x>
- Silva, C. P., Waterfield, N. R., Daborn, P. J., Dean, P., Chilver, T., Au, C. P. Y., ... Ffrench-Constant, R. H. (2002). Bacterial infection of a model insect: *Photorhabdus luminescens* and *Manduca sexta*. *Cellular Microbiology*, *4*(6), 329–339. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2002.00194.x>
- 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. <https://doi.org/10.1128/AEM.02947-06>
- Socha, R., Kodr k, D., & Zemek, R. (1999). Adipokinetic Hormone Stimulates Insect Locomotor Activity. *Naturwissenschaften*, *86*(2), 85–86. <https://doi.org/10.1007/s001140050577>
- Spencer, I. M., & Candy, D. J. (1976). Hormonal control of diacyl glycerol mobilization from

- fat body of the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Insect Biochemistry*, 6(3), 289–296. [https://doi.org/10.1016/0020-1790\(76\)90096-2](https://doi.org/10.1016/0020-1790(76)90096-2)
- Staubli, F., Jørgensen, T. J. D., Cazzamali, G., Williamson, M., Lenz, C., Søndergaard, L., ... Grimmelikhuijzen, C. J. P. (2002). Molecular identification of the insect adipokinetic hormone receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(6), 3446–3451. <https://doi.org/10.1073/pnas.052556499>
- Stone, J. V., Mordue, W., Batley, K. E., & Morris, H. R. (1976). Structure of locust adipokinetic hormone, a neurohormone that regulates lipid utilisation during flight. *Nature*, 263(5574), 207–211. <https://doi.org/10.1038/263207a0>
- Sundar, L., & Chang, F. N. (1993). Antimicrobial activity and biosynthesis of indole antibiotics produced by *Xenorhabdus nematophilus*. *Journal of General Microbiology*, 139(12), 3139–3148. <https://doi.org/10.1099/00221287-139-12-3139>
- 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. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.129346>
- Van der Horst, D. J., Van Marrewijk, W. J. ., & Diederens, J. H. . (2001). *Adipokinetic hormones of insect: Release, signal transduction, and responses*. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(01\)11019-3](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(01)11019-3)
- Van Marrewijk, W. J. A., van den Broek, A. T. M., & Beenackers, A. M. T. (1980). Regulation of glycogenolysis in the locust fat body during flight. *Insect Biochemistry*, 10(6), 675–679. [https://doi.org/10.1016/0020-1790\(80\)90057-8](https://doi.org/10.1016/0020-1790(80)90057-8)
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2010.12.009>
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2006.00804.x>
- Wicher, D., Agricola, H.-J., Söhler, S., Gundel, M., Heinemann, S. H., Wollweber, L., ... Derst, C. (2006). Differential Receptor Activation by Cockroach Adipokinetic Hormones

Produces Differential Effects on Ion Currents, Neuronal Activity, and Locomotion.
Journal of Neurophysiology, 95(4), 2314–2325. <https://doi.org/10.1152/jn.01007.2005>

Wyatt, G. R., & Kalf, G. F. (1956). Trehalose in insects. *Federation Proceedings*, 15, 388.

Yu, X. Q., Zhu, Y. F., Ma, C., Fabrick, J. A., & Kanost, M. R. (2002). Pattern recognition proteins in *Manduca sexta* plasma. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32(10), 1287–1293. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(02\)00091-7](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(02)00091-7)