

Posudek na magisterskou práci Bc. Ivy Bártů s názvem "Vzájemné ovlivňování funkcí adipokinetického hormonu a juvenilního hormonu u plošnice *P. apterus* (Pyrrhocoridae, Heteroptera)"

Obsahem posuzované magisterské práce je studium vlivu analogu juvenilního hormonu methoprenu na působení adipokinetického hormonu (AKH) a jeho obsahu v centrální nervové soustavě a hemolymfě plošnice *Pyrrhocoris apterus*. Pro stanovení obsahu AKH a kvantifikaci vlivu zkoumaného hormonu na mobilizaci lipidů byly použity standardní metody, zejména HPLC pro izolaci AKH, ELISA pro kvantitativní analýzu obsahu AKH ve zkoumaných tkáních, SDS-elektroforéza pro separaci proteinů a následný Western blotting, spektrofotometrické stanovení obsahu lipidů fosfovanilínovou metodou, proteinů metodou s použitím kyseliny bicinchoninové a izolace lipoproteinů selektivní precipitací.

Práce má 37 stran textu a 20 obrázků včleněných přímo do textu. Práce je rozdělena na obvyklé části s tím, že místo Úvodu je Literární přehled a Cíle práce, a Závěr tvoří samostatnou krátkou kapitolu. Literární přehled poskytuje stručný přehled základních znalostí o hmyzích adipokinetických hormonech, metabolismu lipidů přenášených lipophoriny a regulaci pomocí AKH, a o juvenilním hormonu. Přehled končí informací o AKH plošnice *P. apterus*. Metody v práci použité jsou popsány dostatečně podrobně a s odkazy na původní literaturu. Text práce je dostatečně srozumitelný a výstižný, popisky k obrázkům jsou dostatečné s výhradou uvedenou níže. Seznam literatury obsahuje 77 citací.

Předložená práce je podle mého názoru zejména z hlediska zvládnutí řady metodik, ale i s ohledem na množství získaných výsledků, na dobré úrovni, byť řada výsledků byla spíše negativních (to se týká působení methoprenu na mobilizaci lipidů). Výsledky práce potvrzují a rozšiřují dosavadní informace o obsahu a působení AKH na metabolismus lipidů u samců modelového druhu hmyzu a o změnách koncentrace AKH pod vlivem analogu juvenilního hormonu.

K práci mám několik připomínek:

Autorka by měla věnovat větší pozornost kontrole textu, je tam řada překlepů (např. emryogeneze místo embryogeneze (str. 1), neuropetidy místo neuropeptidy (str. 2), popsány místo popsáný (str. 2), pro transport do tkáních (na str. 4), skolofáze místo skotofáze (str. 8), na str. 16 místo PBS uvedeno BPS). Ne zcela srozumitelný je výraz "apoLp-II je zanořen částice uvnitř" (str. 3). České názvy druhů, pokud nejsou na počátku věty, se píšou s malým počátečním písmenem - babočka (str. 2), ruměnice (str. 7). Na str. 12 se píše, že frakce hemolymfy byla odpařena a použita. Jak, byla-li odpařena? Na str. 15 se autorka zkratkovitě vyjádřila: na gel vložila .. samici. Bez odkazu na konkrétní stránku bych doporučil sjednotit psaní slov a u výrazů jako diapausa nebo proteinkinasa používat koncovky se z, jak je nyní obvyklé (když už se použily výrazy např. syntéza, mobilizace, lipáza). Slovo standard a standardní se píše s d. Sjednotit by se mělo také psaní Ringerova pufru (Ringer/Ringr na str. 20).

Na str. 10 by bylo vhodné u promývacího pufru uvést koncentraci Tweenu (Postup metody, bod 1).

Na str. 13 se popisuje metoda stanovení HDLp, LDLp a apoLpIII pomocí metody použité pro tyto proteiny u *Locusta migratoria*. Bylo nějak ověřeno, že tato metoda funguje také u plošnice *P. apterus*?



Na str. 14 při popisu použité metody pro stanovení obsahu proteinů (metoda s použitím kyseliny bicinchoninové) se koncentrace proteinů měřila až 30 minut po ukončení inkubace vzorku s činidlem. Jaký byl důvod?

Nezkoušela autorka v souvislosti s blotem a detekcí vitelogeninu ukázaným na obr. 5 hodnotit alespoň orientačně případné změny v koncentracích ostatních proteinových proužků na gelu po elektroforéze? Pokud by alatektomie ovlivnila pouze koncentraci vitelogeninu v hemolymfě, hladiny ostatních proteinů by zůstaly víceméně na stejné úrovni jako u kontrolních vzorků a lépe by se mohl odhadnout pokles koncentrace vitelogeninu v hemolymfě alatektomované plošnice. Z obrázku jsem získal dojem, že koncentrace ostatních proteinových frakcí mohly být po alatektomii nižší.

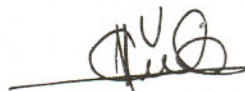
Na obr. 14 a 15 a 19 a 20 nejsou na grafech uvedeny standardní odchylky. Kolik pokusných jedinců bylo vlastně použito? V popisu grafů č. 7 až 20 vůbec scházejí údaje o počtech analyzovaných jedinců a nejsou ani nikde v textu jednotlivých kapitol. U grafů č. 19 a 20 neodpovídá značení sloupce M6/A90 v grafu a v popisu grafu.

Na str. 28 se v prvním odstavci popisují hladiny AKH v nervové soustavě u makropterních, reprodukčních a brachypterních samic. Předpokládám, že i reprodukční samice byly brachypterní, a ty označené jako brachypterní byly diapauzní? Jak koresponduje popis koncentrace AKH u reprodukčních (brachypterních) samic v odstavci 1 a u kontrolních brachypterních samic v první větě odstavce 2?

Poznámka k diskusi: A.J. Zera studoval účinek methoprenu na mobilizaci lipidů u křídelních forem cvrčka *Gryllus firmus* a zjistil, že methopren inhiboval mobilizaci lipidů (*American Naturalist* **152**, 7-23 (1998), *Physiol. Biochem. Zool.* **77**, 255-266 (2004)).

Připomínky uvedené výše jsou většinou formálního rázu a kvalitu práce rozhodujícím způsobem neovlivňují. Předložená práce prokazuje schopnost autorky zvládnout za použití řady náročných analytických metod zadaný úkol a splnit tak požadavky potřebné pro získání magisterské hodnosti.

V Č. Budějovicích 24.5.2006



Jan Šula

Oponentský posudek na magisterskou diplomovou práci **Bc. Ivy Bártů "Vzájemné ovlivňování funkcí adipokinetického hormonu a juvenilního hormonu u plošnice *Pyrrhocoris apterus*"**

Hlavním cílem magisterské práce bylo objasnit vliv methoprenu na funkci adipokinetického hormonu (AKH) u plošnice *Pyrrhocoris apterus*. Byl studován vliv methoprenu jednak na adipokinetickou odpověď (stimulace hladiny lipidů v hemolymfě po aplikaci AKH), jednak na obsah AKH v CNS a hemolymfě. Kromě toho byl měřen vliv methoprenu a AKH na energetický metabolismus (produkci CO<sub>2</sub>) a hladinu lipophorinů v hemolymfě.

Mám několik připomínek a dotazů.

1. Vliv methoprenu na adipokinetickou odpověď byl hodnocen jednak u intaktních reprodukčních samic, jejichž corpus allatum (CA) produkuje vlastní juvenilní hormon (JH), jednak u allatektomovaných samic, u nichž vlastní JH chybí. U obou skupin neměl methopren vliv na rozdíl v hladině lipidů po a před injekcí AKH, což vedlo autorku k závěru, že methopren nemá vliv na mobilizaci lipidů stimulovanou AKH (str. 19, 27). Domnívám se však, že tento výsledek zcela nevyloučil vliv JH na adipokinetickou odpověď. Podobný rozdíl hladin lipidů u intaktních a allatektomovaných samic (obr. 7 a 8) může ve skutečnosti znamenat různě silnou adipokinetickou odpověď, pokud jsou počáteční hladiny (t.j. před injekcí AKH) rozdílné. V práci je uvedena počáteční hladina lipidů u intaktních samic (obr. 10, pokud kontrola = aceton), ale tento údaj pro allatektomované samice není v práci uveden. Vzhledem k tomu, že hladina lipidů u allatektomovaných samic po stimulaci AKH (obr. 11) byla podobně vysoká jako počáteční hladina lipidů u intaktních samic (obr. 10), lze předpokládat, že počáteční hladina lipidů byla u allatektomovaných samic podstatně nižší. V tom případě by podobný rozdíl v hladinách lipidů mohl ukazovat na relativně silnější adipokinetickou odpověď u allatektomovaných samic, tedy vlastně stimulaci adipokinetické odpovědi nepřítomností vlastního JH ploščic. V této souvislosti mám dva dotazy:

a) Jaký je Váš názor na tuto interpretaci v souvislosti s rozdílnou adipokinetickou odpovědí u makropterních a brachypterních ploščic zmíněnou v diskusi?

b) Proč není v práci uvedena počáteční hladina lipidů u allatektomovaných samic?

2. Je pozoruhodné, že hladiny AKH v hemolymfě jsou po aplikaci methoprenu podobně vysoké bez ohledu na přítomnost vlastního CA. Vzhledem k tomu, že existuje zpětná vazba mezi JH a aktivitou CA, není vyloučeno, že methopren potlačil aktivitu vlastního CA a zcela převzal úlohu JH při uvolňování AKH do hemolymfy. V tom případě by rozdílný vliv methoprenu na allatektomované a intaktní samice byl méně překvapivý.

3. Používání výrazu kontrola je v některých případech matoucí. U intaktních samic zřejmě kontrola = aceton (obr. 10, 12-15), kdežto u allatektomovaných samic kontrola = aceton + AKH (obr. 8 a 11).

4. Chybí údaj o počtu jedinců použitých pro stanovení AKH v hemolymfě. Kolik jedinců představuje směsný vzorek 20 ul a kolik bylo opakování?

Domnívám se, že hlavní cíle práce byly splněny - uvedené připomínky předkládám spíše k zamyšlení pro případnou publikaci. Práce je napsána srozumitelně a obsahuje poměrně málo stylistických chyb a překlepů. Literární úvod je napsán přehledně a svědčí o dobré teoretické znalosti problematiky. Také je nutné ocenit zvládnutí několika biochemických metodik. Proto práci vřele doporučuji k obhajobě.

V Českých Budějovicích 23.5.2006



Doc. RNDr. Magdalena Hodková, CSc.