

Jihočeská universita v Českých Budějovicích  
Přírodovědecká fakulta



Bakalářská práce

# Vliv omezeného příjmu potravy na délku života u modelového hmyzu

Vypracovala: Marcela Buřičová  
Vedoucí práce: Doc. RNDr. Magdalena Hodková, CSc.

České Budějovice 2008

## Bakalářská práce

Buřičová, M., 2009: Vliv omezeného příjmu potravy na modelový hmyz. [The effect of food restriction on longevity in an insect model. Bc. Thesis, in Czech.] - 40 pp., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

### Anotace:

It is known that the restricted food intake in many species extends lifespan by slowing and/or delaying the aging processes. The underlying biological mechanisms responsible for the lifespan extension are still not known, although several hypotheses have been proposed. Cost of reproduction, where the lifespan and fecundity are negatively correlated, is of widespread occurrence. In females of the linden bug *Pyrrhocoris apterus* no evidence for a trade-off between lifespan and fecundity were observed. Restriction of food intake reduces egg production but has no effect on lifespan.

Tato práce byla financována z prostředků projektu GAČR č. 206/05/2222

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů 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.

V Českých Budějovicích 7. 1. 2009

Marcela Buřičová

Velmi ráda bych poděkovala své školitelce Doc. RNDr. Magdaleně Hodkové, CSc. za laskavý a trpělivý přístup při vedení mé bakalářské práce. Další poděkování patří RNDr. I. Hodkovi za podnětné připomínky. H. Vaněčkové Bc. a paní Mikešové za pomoc při pokusech. Na závěr děkuji své rodině a přátelům za podporu, kterou mi věnovali v průběhu psaní bakalářské práce.

Obsah	
1 ÚVOD	5
1.1 Stárnutí .....	5
1.1.1 Evoluční teorie	5
1.1.1.1 Teorie akumulace mutací.....	6
1.1.1.2 Teorie antagonistické pleiotropie .....	6
1.1.1.3 Disposable soma teorie.....	6
1.1.2 Mechanické teorie	7
1.1.2.1 Oxidativní stres .....	7
1.1.2.2 Buněčná signalizace .....	8
1.1.2.3 Změny v genové expresi, proteinová degradace .....	9
1.1.2.4 Glykace a glykoxidace .....	9
1.1.2.5 Omezený příjem potravy .....	10
1.1.2.5.1 Mechanismy iniciující a kontrolující odezvu na CR	11
1.1.2.5.2 Mechanismy redukující rychlost mortality	12
1.1.2.5.3 Vztah CR a reprodukce	13
2 CÍLE PRÁCE	16
2.1 Vztah mezi potravními režimy a délkou života.....	16
2.2 Vztah mezi potravními režimy a reprodukcí.....	16
2.3 Vztah omezeného příjmu potravy, reprodukce a dlouhověkosti .....	16
3 MATERIÁL A METODY	17
3.1 Modelový organismus .....	17
3.2 Měření přijatého množství potravy .....	17
3.3 Pokusy .....	18
3.4 Grafické zpracování a statistika .....	19
4 VÝSLEDKY	20
4.1 Příjem potravy během 2-3 reprodukčních cyklů měřený plochou exkrementů .....	20
4.2 Vliv omezeného příjmu potravy na produkci vajíček, množství exkrementů a délku života .....	23
4.3 Vztah mezi množstvím exkrementů, intenzitou kladení a délkou života.....	24
4.4 Vliv denního omezení příjmu potravy na délku života – předběžný pokus.....	25
4.5 Vliv denního omezeného příjmu potravy na produkci vajíček – předběžný pokus ..	26
4.6 Vliv denního omezení příjmu potravy na délku života, reprodukčního a postreprodukčního období .....	27
4.7 Vliv denního omezeného příjmu potravy na produkci vajíček a intenzitu kladení...	29
4.8 Vztah mezi délkou života a reprodukcí.....	30
5 DISKUZE	32
6 ZÁVĚR	35
7 SEZNAM LITERATURY	36

# 1 ÚVOD

## 1.1 Stárnutí

Senescence, jinak řečeno stárnutí, je definováno jako pokles fyziologické výkonnosti s postupujícím věkem a současně vedoucí k poklesu reprodukce, vzrůstu mortality, nebo k obojímu. (Finch 1990, Abrams 1991, Rose 1991, Holmes a Austad 1995a, Ricklefs 1998). Stárnutí je téměř universální pro všechny mnohobuněčné organismy (Hughes a Reynolds 2005), i když existují organismy, kterým se stárnutí téměř vyhýbá (Martinez 1997) a ty, které jej přes rychlost žití dokáží oddalovat lépe, než jiní (Holmes a Austad 1995b).

Délka života je druhově specifická a je to hlavně funkce schopnosti přežití a reprodukce v soutěživém životním prostředí. U organismů, které umírají hlavně kvůli predaci a nebezpečnému životnímu prostředí, se vyvinula optimální délka života, která je přiměřena jejich specifickému životnímu prostředí (Weinert a Timiras 2003).

Dnes existuje několik teorií, které popisují proč a jak ke stárnutí dochází. Tyto teorie se dají shrnout do dvou větších podskupin: základních (ultimátních) teorií evolučních a popisných (proximátních) teorií mechanických. Samozřejmě se vyvinuly i mechanismy, které stárnutí oddalují. Opravování škod je však stíženo tím, že ne všechny buňky se u mnohobuněčných organismů stále dělí (např. neurony).

### 1.1.1 Evoluční teorie

První, již neplatná, verze evoluční teorie se, podle Weismanna (1891), zaobírala myšlenkou, že stárnutí je pro organismus naprogramované a měly by tedy existovat geny pro stárnutí. Jedním z důvodů zpochybňujících tuto myšlenku je ten, že kdyby existoval gen, který by způsoboval stárnutí, pak by v průběhu vývoje života zajisté došlo k mutaci, která by jej inaktivovala, což by zvýhodnilo jedince s touto mutací a gen by se rozšířil. K tomu však nedošlo.

Dnešní evoluční teorie říká, že stárnutí nastává z dvou hlavních důvodů, (i) tlak přírodního výběru klesá s věkem, a (ii) dlouhověkost požaduje údržbu a opravu buněk, což konkuruje růstu, reprodukci a činností, které by mohly zvýšit fitness (Kirkwood 2002).

Do podskupin evolučních teorií patří akumulace mutací, antagonistická pleiotropie a disposable soma teorie.

#### **1.1.1.1 Teorie akumulace mutací**

Teorie akumulace mutací, navržená Medawarem (1952), popisuje stárnutí jako proces, ve kterém se škodlivé, později se projevující mutace, mohou shromažďovat v populaci a vést ke stárnutí (Weinert a Timiras 2003). V podstatě mutace, které postihují zdraví v pozdním (poreprodukčním) věku, nejsou znevýhodňovány přírodním výběrem.

Tato teorie byla zformulována na základě pozorování Huntingtonovy nemoci, kde dominantní letální alela nebyla v přírodním výběru znevýhodněna, i když by pro svou škodlivost vyselektována být měla (Haldane 1941).

#### **1.1.1.2 Teorie antagonistické pleiotropie**

V roce 1957 Williams rozšířil teorii akumulace mutací o pleiotropní geny. Vzniká tak teorie antagonistické pleiotropie ukazující na mutace, které mohou zvýhodnit život jedince v mládí a naopak znevýhodnit ve stáří. Tento typ mutací bude v populaci upřednostňován, tedy převáží nad mutacemi negativně ovlivňujícími mladého jedince a zároveň zvýhodňujícími jej ve stáří (Hughes a Reynolds 2005).

#### **1.1.1.3 Disposable soma teorie**

Speciálním případem antagonistické pleiotropie je “disposable soma teorie” rozpracovaná Kirkwoodem (1977).

Teorie je založena na předpokladu, že údržba a oprava buňky jsou metabolicky náročné, a že metabolické zdroje určené k reprodukci není možno použít na údržbu a opravu buňky. Škody se hromadí v buňce a znamenají pro ni stárnutí, případně smrt (Hughes a Reynolds 2005).

Kirkwood (1993, 1997) zvažoval, že je bezvýznamné investovat příliš mnoho energie na údržbu, když šance žít dlouho je malá. Pro všechny druhy organismů existuje rovnováha mezi údržbou a reprodukcí. Když se zlepší životní podmínky, a tím šance pro delší život, je

užitečné posunout rovnováhu, směrem k údržbě; tak se prodlouží reprodukční období a zpomalí se stárnutí (Le Bourg 2001).

### **1.1.2 Mechanické teorie**

Mechanické teorie se zabírají popisem mechanismů, které způsobují stárnutí organismu. Těchto teorií se za dobu, kdy je stárnutí v zájmu výzkumu, vytvořilo mnoho, ale v dnešní době se uznává jen několik z nich. Mezi něž patří oxidativní stres, buněčná signalizace, glykace, změny v genové expresi – proteinová degradace a omezený příjem potravy. Mezi teorie, které nebyly experimentálně potvrzeny, a byly donedávna uznávány, patřily “rate of living” a krácení telomer.

#### **1.1.2.1 Oxidativní stres**

Teorie oxidativního stresu, kterou vyjádřil Harman (1956) říká, že volné kyslíkové radikály, tvořené vnitrobuněčně při normálním využívání kyslíku metabolismem buňky, hrají základní roli v procesu stárnutí, které je následkem kumulací škod způsobených reaktivními druhy kyslíku (ROS). Harman teorii volných radikálů později rozšířil o místo, kde vzniká největší množství škod, tedy v mitochondriích (Harman 1972). Mitochondrie produkují nesrovnatelně větší množství ROS, protože zde dochází až k 90% spotřebě kyslíku buňkou (Perez-Campo et al. 1998). ROS zasahují i ostatní části buňky, kde poškozují proteiny, lipidy i jadernou DNA. Některé enzymy, označované jako antioxidanty, dokáží zmírnit škody způsobené oxidačním stresem. Např. u hmyzu jde o superoxid dismutázu (SOD), která se u něj nachází ve dvou formách, nebo katalázu (CAT). Zdá se, že důležitou roli má i methionin sulfoxid reduktáza (MsrA), která je schopna opravovat oxidované proteiny (Hughes a Reynolds 2005).

Je prokázáno, že omezení příjmu potravy zpomaluje rychlost vzniku oxidativních škod v DNA, proteinech a lipidech, a tím zpomaluje stárnutí u zvířat v redukčním dietním režimu. Předpokládá se, že je to díky snížení produkce volných radikálů v mitochondriích v různých tkáních zvířete v dietním režimu (Gredilla a Barja 2005). Hlubší studie určily jako největší zdroj ROS čtvrtou fázi dýchacího cyklu (Boveris a Chance 1973), která je řízena rychlostí prostupování protonů přes vnitřní mitochondriální membránu (Brand a Murphy 1987). Zatím

však není známo, jakým způsobem je zahrnuto omezení příjmu potravy v regulaci prostupování protonů přes membránu.

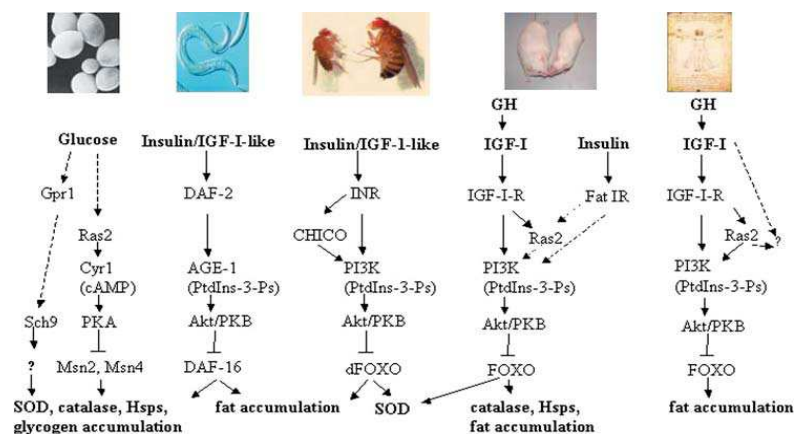
Dalším způsobem, kterým by mohl omezený příjem potravy redukovat škody způsobené oxidativním stresem je aktivace antioxidantů. Objevují se ale studie, např. krysích jater a srdce, myších kosterních svalů, mozku, srdce a ledvin, které nedokáží jasně popsat vztah mezi antioxidanty a omezeným příjmem potravy, a jasně tak určit antioxidanty jako faktory snižující oxidativní škody u zvířat v dietním režimu (Gredilla a Barja 2005).

### 1.1.2.2 Buněčná signalizace

#### a) signální dráha inzulínu

Úloha inzulínu a inzulínu podobných růstových faktorů (IGF) v regulaci stárnutí je považovaná za evolučně konzervovanou (Clancy et al. 2001). Působení těchto signálních drah se dá zkoumat na mutantech nesoucích mutaci právě v určené signální dráze. *Drosophila* nesoucí mutaci *chico* (gen *chico* kóduje inzulínový receptorový signál, který působí v inzulín/IGF signálních drahách-IIS) prodlužuje život u homozygotů o 45%, u heterozygotů o 36% (Clancy et al. 2001). Mutace v inzulín podobných receptorech (*InR*) u *Drosophily* způsobuje trpasličí vzrůst, ale prodlouží život až o 85% (Tatar 2001). Homologem *InR* je u savců inzulínový receptor a u háďáka je to *daf-2*. Mutace *daf-2* prodlužuje délku života u *Caenorhabditis elegans* na dvojnásobek oproti divokému typu (Kenyon et al. 1993).

U opic bylo prokázáno, že jedinci v omezeném potravním režimu jsou citlivější na inzulín než kontroly (Ramsey et al. 2000).



Řízení dlouhověkosti IIS signálními drahami u různých druhů živočichů. Podle Katic a Kahn 2005



## **b) další signální dráhy**

Snížení aktivity genu *methuselah* u *Drosophily* způsobuje přibližně o 35% vyšší průměrnou délku života a zároveň zvyšuje rezistenci k různým formám stresu, zahrnujícím hladovění, vysokou teplotu, paraquat a volné radikály (Lin et al. 1998). Produktem genu *methuselah* je transmembránový G-protein a je tedy možné, že ovlivňuje některé signální dráhy.

### **1.1.2.3 Změny v genové expresi, proteinová degradace**

Neustálý turnover vnitrobuněčných proteinů má základní roli pro udržování buněčné homeostáze a regulaci funkcí mnohobuněčných organismů (Martinez-Vicente 2005). Stárnutí je spojeno se snižováním rychlosti degradace proteinů a dnes ještě stále nejsou známy mechanismy, které zde hrají hlavní roli (Martinez-Vicente 2005). Může se jednat o důsledek deregulace genové exprese, deregulace je jedním z možných mechanismů, které zvyšují poškození DNA a v konečném důsledku mohou vést k buněčnému poškození a smrti (Bahar et al. 2006). Stárnutí vede k pozměněné genové expresi, těmto změnám může úplně nebo částečně zabránit omezení příjmu potravy.

### **1.1.2.4 Glykace a glykooxidace**

Tato teorie stárnutí říká, že tkáňové a buněčné škody, způsobené neenzymatickou glykací, Maillardovými reakcemi a následnými úpravami makromolekul, jsou považovány za jednu z příčin stárnutí (Kristal a Yu 1992; Weindruch et al. 2001). Maillardovou reakcí pomalu vznikají toxické a reaktivní sloučeniny převážně neznámé struktury, které se nazývají koncové produkty glykace (advanced glycation end products, AGEs) (Weindruch et al. 2001). AGEs se mohou spojit s proteiny a tím způsobit tuhnutí pojivových tkání nebo při navázání na některá místa buňky mohou vyvolat zánětlivé reakce a stimulaci tvorby volných radikálů. Hlavní princip jejich patologického působení spočívá v navázání AGEs na receptory buněčného povrchu, zahrnující i specifický receptor pro AGEs (RAGEs). Bylo jasně prokázáno, že navázání AGEs na RAGEs způsobuje patologické změny v mnoha cílových buňkách (Weindruch et al. 2001). Obsah AGEs zvyšuje např. hyperglykémii (Suji a Sivakami 2004).

### 1.1.2.5 Omezený příjem potravy

Omezení příjmu potravy, aniž by došlo k nesprávné výživě (podvýživě), dosahuje z hlediska prováděných experimentů nejsoudržnějších výsledků v prodlužování jak maximální, tak průměrné délky života u různých živočišných druhů, od kvasinek a bezobratlých až po savce. Omezení příjmu potravy prodlužuje délku života u evolučně rozdílných organismů, a proto je tento mechanismus považován za evolučně původní (Patridge a Brand 2005). Toto tvrzení ale nyní popírá chování dalších modelových organismů vystavených omezenému příjmu potravy. A to - u DBA/2 linie myši (Forster et al. 2003), u mouchy domácí (*Musca domestica*), vrtule velkohlavé (*Ceratitis capitata*) a octomilky (*Drosophila melanogaster*) – dokazuje, že tento fenomén není universálně přijatelný. U výše zmíněných druhů je vliv omezeného příjmu potravy na délku života následující – negativní vliv na dlouhověkost u mouchy, neutrální u vrtule a pozitivní nebo spíše vesměs neznámý u octomilky (Mockett et al. 2006). Jako vysvětlení od Bourga a Minoise (2005) přichází myšlenka, že druhy, které jsou schopné rychle měnit prostředí, nemusí být schopné prodloužit délku života na základě omezeného příjmu potravy, protože opustit nehostinné prostředí je pro ně méně energeticky náročné řešení. Proto některé druhy much (*D. melanogaster*, *C. capitata* a *M. domestica*) nepřežijí dlouho při omezeném příjmu potravy, protože mohou snadno opustit nehostinné prostředí. Podobné chování se očekává i u migrujícího ptactva.

Pro omezený příjem potravy můžeme použít i jiné označení a to kalorické omezení (caloric restriction, CR) nebo dietní omezení (dietary restriction, DR). Mezi těmito dvěma názvy je rozdíl. Pokud dochází ke CR, je to omezení příjmu kalorií jako celku, bez ohledu na jednotlivé složky potravy. DR pak rozlišuje mezi jednotlivými složkami potravy a vyhodnocuje jejich výživové faktory. Masoro (1988) uvedl, že prodloužení délky života závisí na snížení množství kalorií jako takovém a ne na jednotlivých složkách diety. Další studie však prokázaly, že když dojde k omezení proteinů v potravě, dojde ke snížení produkce ROS v mitochondriích a ke snížení škod v DNA stejně, jako při celkové kalorické redukci (Sanz et al. 2004). Pokusy byly vedeny až na základní stavební kameny proteinů (aminokyseliny), kde jsou výsledky poněkud nesourodé. Masoro (1989) uvádí, že omezení methioninu nehraje roli v prodlužování délky života při CR. Omezení methioninu v potravě ale prodlužuje délku života u krys (Orentreich et al. 1993).

DR může působit více než jedním způsobem v prodlužování délky života, to s rozdílnými živinami hrajícími roli v různých mechanismech (Partridge et al. 2005). Což potvrzuje studie na octomilce, kde CR nemá žádný vliv na délku života (Lee et al. 2008).

#### 1.1.2.5.1 Mechanismy iniciující a kontrolující odezvu na CR

Existují dvě možnosti jak může omezený příjem potravy prodlužovat délku života. Prostřednictvím nervových nebo endokrinních signálů z tkání citlivých na živiny nebo prostřednictvím přímé citlivosti buněk na živiny (Partridge et al. 2005).

Mechanismy, které byly zahrnuty do zprostředkování prodloužení délky života v odpovědi organismu na DR jsou: společný transport kódovaný genem *Indy*, inzulinový/IGF-like signální dráhy (IIS), Rpd3 deacetyláza, dSir2 (silent information regulator) protein deacetyláza a rapamycinové signální dráhy (TOR – target of rapamycin).

Mutace *Indy* v heterozygotním stavu prodlužuje délku života jak u samic tak u sameček octomilky (Rogina et al. 2000). Mutace v *Indy* prodlužuje délku života snižováním rychlosti mortality, která se s věkem zvyšuje (Marden et al. 2003), zatímco DR zvyšuje délku života koordinovaným snižováním rychlosti mortality ve všech věkových kategoriích (Mair et al. 2003), což naznačuje, že tyto dva mechanismy prodlužují délku života jinými způsoby.

U *Drosophily* IIS signální dráhy regulují růst a koordinují jej se zásobováním živinami během období růstu (Brottion et al. 2002). Mutace *chico* u octomilek hraje důležitou roli v IIS. Pokud se homozygotní samičky s *chico* mutací vystaví DR různě ředěnými roztoky potravy, jejich maximální délka života se objeví při vyšším množství potravy v roztoku než u kontrol. A naopak, při množství potravy maximalizující délku života kontrolám dochází u mušek s mutací *chico* ke zkrácení délky života (Clancy et al. 2002). Z čehož vyplývá, že samičky s mutací *chico* jsou částečně potravně omezeny jejich genotypem. Nebo, že *chico* samičky jedí méně než kontroly a nebo, že IIS signální dráhy ovlivňují odpověď dlouhověkosti vzhledem k příjmu potravy (Partridge et al. 2005).

U kvasinek odstraněním genu, kódujícího histonovou deacetylázu (Rpd3), prodloužíme délku života. Při vystavení takto mutovaných kvasinek DR nedochází k dalšímu prodloužení života, což naznačuje, že Rpd3 má úlohu ve zprostředkování odpovědi dlouhověkosti na DR (Jiang et al. 2002). Podobné výsledky byly získány i u *Drosophily*.

Gen SIR2, který kóduje protein deacetylázu, byl také určen jako zprostředkovatel

v prodloužení délky života dietním režimem. U kvasinek má zvýšení exprese SIR2 za následek prodloužení života, ale u SIR2 nulových mutantů už k prodloužení při DR nedochází (Lin et al. 2000). Ale zdá se, že SIR2 není nezbytný pro prodloužení délky života, jak ukázaly dvě další linie kvasinek, které s mutací v SIR2 vykazovaly normální délku života při snižování glukózy v podávané potravě (Kaeberlien et al. 2004).

TOR signální dráhy interagují s IIS signálními drahami při kontrole růstu a se zásobaváním živinami (Colombani et al. 2003). A opět u mušek s mutací *chico*, odpověď na množství potravy v ovlivnění délky života určila TOR jako zprostředkovatele této odpovědi (Kapahi et al. 2004). Řízení TOR signální dráhou může ovlivnit stravovací chování a nebo přímo ovlivňovat citlivost na živiny. Zdá se, že TOR autonomně ovlivňuje citlivost buněk na živiny v tukovém tělese larev a neautonomně reguluje růst u ostatních tkání. Je možné, že způsob, jakým tyto regulace probíhají, je v upravování propustnosti IIS ligandů do cílových tkání (Colombani et al. 2003).

#### **1.1.2.5.2 Mechanismy redukující rychlost mortality**

To, jak působí omezený příjem potravy na prodloužení délky života, je stále otázkou a to nepříliš snadnou. Kaskády změn, které jsou spuštěny, nejsou stále všechny známy a samozřejmě se mohou i navzájem ovlivňovat. Výše zmíněné mechanické i evoluční teorie vzájemně souvisejí a odhalit funce jednotlivých mechanismů proto není příliš snadné.

Důležitým hlediskem je věk, ve kterém začneme s omezováním příjmu potravy a jak dlouho tento režim následně udržujeme. Samozřejmě musí být zachován základní příjem živin. Pozitivní účinky byly pozorovány při zahájení dietního režimu v mládí i ve středním věku (Gredilla a Barja 2005), ale u starších jedinců byl zaznamenán trend opačný (Foster et al. 2003). U většiny hlodavců 30-50% redukce kalorického příjmu v raném období života (1-3 měsíce věku), která způsobí opoždění růstu, vede k prodloužení maximální délky života o 30-50% (Ramsey et al. 2000). Několik studií bylo věnováno omezenému příjmu potravy ve starším věku pokusných zvířat. Např. u dlouhověkých myší byla dieta nasazena v jejich středním věku a výsledné prodloužení maximální délky života bylo o 10-20% (Weindruch a Walford 1982).

### 1.1.2.5.3 Vztah CR a reprodukce

Prodloužení délky života při CR je obvykle spojeno se snížením plodnosti (trade-off) (Partridge et al. 2005). Jako možné vysvětlení škodlivého vlivu reprodukce na organismus se považuje buď to, že dochází k alokaci energie mezi reprodukcí a opravami - údržbou těla nebo protože přímo negativně působí na organismus (Partridge a Gems 2002, Barnes a Partridge 2003).

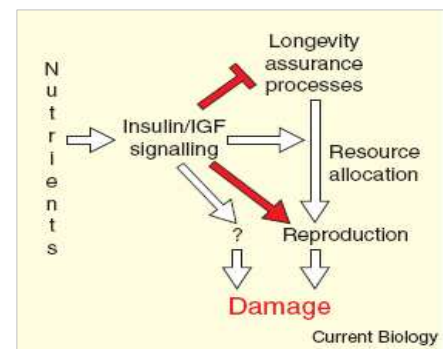
Zdá se, že množství potravy reguluje trade-off mezi plodností a dlouhověkostí přes působení insulinu. Není však zcela jisté, zda je délka života ovlivňována reprodukcí.

Experimenty, které podpořily hypotézu trade-off, pocházejí z pokusů, při kterých bylo užito *Drosophila* s mutací *chico*. *Chico* hraje svou roli v signálních inzulinových cestách. Dietní režim CR prodloužil délku života divokým typům octomilek, ale neměl žádný účinek na typy s mutací *chico* (Clancy 2002). Což tedy naznačuje, že dlouhověkost je ovlivněna stejnou signální cestou jako mutace *chico*, tedy signální cestou insulinu. Podobně působí histon deacetylázový gen, *rpd3*.

Platnot teorie trade-off zpochybňují mutace v IIS spolupůsobících s CR, které mohou prodloužit délku života u mnoha modelových organismů, ale ne vždy redukují plodnost, to znamená, že vzájemná spojitost mezi délkou života a plodností nemusí vždy platit (Partridge et al. 2005).

Např. mutace v *daf-2* u *C.elegans*, kodující IIS receptory, prodlužuje délku života aniž by snižovala reprodukci (Gems et al. 1998; Kenyon et al. 1993). A obdobná situace je i u *Drosophila*, kdy ne všechny zásahy do IIS, které prodloužily délku života, omezovaly reprodukci (Partridge et al. 2005).

To, že samotná produkce vajíček nezkracuje délku života, je potvrzeno zjištěním, že odstraňováním zárodečných buněk i celých gonád u *C.elegans* nedochází k prodloužení délky života (Hsin a Kenon 1999). Podobně při odstranění zárodečných buněk pomocí mutace *grandchildless* nedochází k prodloužení



Tento obrázek ukazuje tři možné způsoby regulace IIS drahami navozené živinami: 1) přímé prodloužení délky života a snížení reprodukce 2) relokace živin od údržby buněk na reprodukci 3) aktivace procesů způsobující somatické škody. Podle Partridge a Gems 2002

délky života (Barnes et al. 2006).

Trade-off mezi reprodukcí a délkou života je pokládán za evoluční adaptaci na periodický nedostatek potravy. Pokud jsou podmínky nevhodné a je nízké přežívání mláďat, reprodukční úspěch bude zajištěn snížením reprodukce a zároveň zvýšením schopnosti přežití dokud nedojde k obnovení hojnosti, a to by zvýšilo šance potomstva na přežití (Partridge et al. 2005). U některých druhů vodních ploštic bylo prokázáno, že samičky, které byly schopny udržet vysokou intenzitu reprodukce při potravním stresu, vykazovaly kratší délky života. Pokud začalo být jejich životní prostředí nestálé, reprodukce byla snížena ve prospěch delšímu životu (Kaitala 1991). O deset let později získal obdobné výsledky na vířnících Kirk (2001). Druhy, které při hladovění omezily reprodukci, prodloužily délku života při CR a naopak druhy, které při hladovění neomezily intenzitu reprodukce, umíraly dříve v CR režimu. Avšak některé druhy vodních ploštic buď snižují nebo zvyšují produkci vajíček bez jakéhokoliv vlivu na délku života (Kaitala 1991). U mouchy *Ceratitis capitata* mírná redukce příjmu potravy nemá vliv ani na plodnost ani na délku života (Carey et al. 2002a).

Zjišťoval se také vliv skladby potravy na dlouhověkost a reprodukci u octomilek, kde se zjistilo, že roli hraje poměr karbohydrátů k proteinům. Maximální délky života je dosaženo při poměru 1:16, proteiny : karbohydráty, a pokud se podíl proteinů zvyšuje, klesá délka života. S reprodukcí je to jinak. Největší je při poměru 1:2, proteiny : karbohydráty. Zajímavé je, že pokud se poměr proteinů dále snižoval došlo k poklesu jak reprodukce, tak délky života i přesto, že celkový příjem energie byl nelimitující (Lee et al. 2008).

Je zřejmé, že vztah mezi reprodukcí a délkou života při CR je specifický pro druh, pro populaci a pro prostředí, ve kterém živočich žije. Náš modelový organismus ploštice ruměnice pospolná *Pyrrhocoris apterus* patří k druhům přizpůsobeným na stálé životní prostředí se stálou zásobou živin, většinou v podobě lipových semínek. Předchozí pokusy ukázaly, že délka života samic je modulována signály z pars intercerebralis mozku (insulinem a dalšími, zatím neznámými faktory) a corpus allatum (juvenilním hormonem), ale vliv těchto signálů nesouvisí s plodností (Hodková 2008). Aktivita corpus allatum je stimulována příjmem potravy (Hodková 1982, Hodková et al. 2001).

Ovšem vztah omezeného příjmu potravy, dlouhověkosti a reprodukce u tohoto druhu nebyl zatím prostudován. Cílem mé práce je proto zjistit vliv omezeného příjmu potravy na délku života a reprodukci u ploštice ruměnice pospolné *P. apterus*.

## 2 CÍLE PRÁCE

Cílem této bakalářské práce bylo ověřit vliv omezeného příjmu potravy na délku života a reprodukci u modelového organismu *Pyrrhocoris apterus*. Zjistit vliv různých potravních režimů na kladení a dlouhověkost.

### 2.1 Vztah mezi potravními režimy a délkou života

– zjistit délku života u modelového organismu v různých potravních režimech

### 2.2 Vztah mezi potravními režimy a reprodukcí

– zjistit vliv různých potravních režimů na délku reprodukčního a poreprodukčního období, intenzitu reprodukce (počet vajíček/den) a plodnost (celkovou produkci vajíček)

### 2.3 Vztah omezeného příjmu potravy, reprodukce a dlouhověkosti

– zjistit zda omezený příjem potravy ovlivňuje vztah mezi reprodukčními parametry a délkou života



## 3 MATERIÁL A METODY

### 3.1 Modelový organismus

K prováděným pokusům se jako modelový organismus používaly samice ruměnice pospolné (*Pyrrhocoris apterus*) (L.) z podřádu ploštic (Heteroptera). Jednalo se o nediapauzní jedince, kteří byli od úplného začátku vývoje drženi v termostatech při konstantní teplotě  $26 \pm 2$  °C. Světelný režim byl 18 hodin světla a 6 hodin tmy, tento režim se nazývá dlouhý den – long day, LD. Jedinci v těchto podmínkách nenastupují do diapauzy. Od vajíček až do pátého instaru byly ploštice drženy v cca 0,5 litrových lahvích na lipových semínkách ad libitum a vodě. Ploštice prodělává 5 instarů před imagem. Každý instar absolvuje zhruba v jednom týdnu. Čerstvě vylíhlá imaga byla izolována a první den držena jen na vodě. Další den dostala potravu, lipová semínka, ale už podle přiřazeného dietního režimu za stálé přítomnosti pitítka s vodou a separována do Petriho misek. Délka držení na omezeném příjmu potravy viz. jednotlivé pokusy.

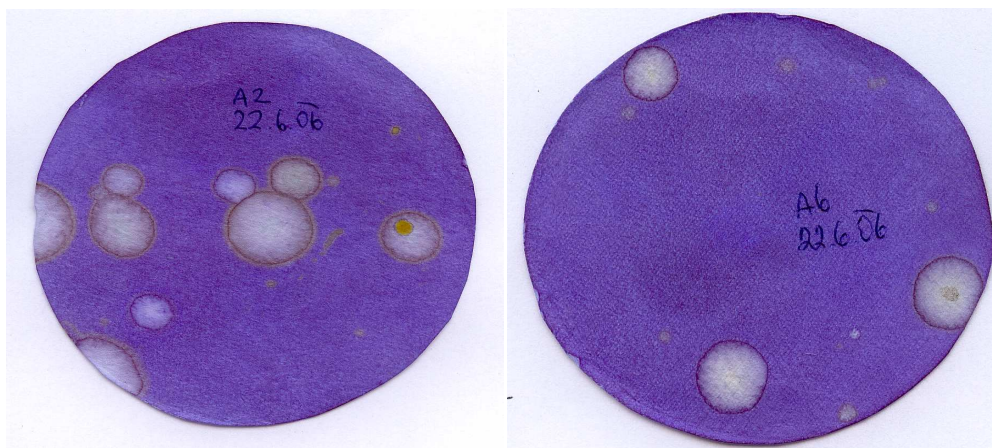
### 3.2 Měření přijatého množství potravy

V některých pokusech se množství přijaté potravy zjišťovalo nepřímo podle množství exkrementů. Každá jednotlivá ploštice měla ve spodní části Petriho misky filtrační papír o stejném průměru jako vnitřní prostor Petriho misky (cca 7 cm). Papírky byly napuštěny roztokem fenolftaleinové modří v ethanolu. Výkaly tvořily na napuštěném papírku barevně odlišitelné plochy (viz. Obr. 1), které bylo možno měřit. Plochu odbarvenou exkrementy jsem měřila pomocí PHOTOSHOPu a funkce *arbitrary area*. U každého měření jsem prováděla novou kalibraci, aby nedocházelo k velkým chybám. Primárně získané hodnoty byly v pixelech. Díky porovnání s kalibrací jsem pixely mohla převést na jednotky plochy. Postup přepočtu byl následující.

x...plocha v  $\text{mm}^2$

y...plocha v pixelech

$$x = y/146,4$$



Obr.1.: Ukázka filtračního papíru napuštěného fenolftaleinovou modří. Světlé plochy jsou odbarveny exkrementy.

### 3.3 Pokusy

Všechny pokusy měly podobné provedení. Lišily se v dietních režimech, počtech samic a popřípadě sledovanými hodnotami. Jednotlivé potravní režimy jsem začala měřit prvně v delších časových úsecích, abych mohla zjistit, kde se vyskytuje určitá hranice, kdy dochází k rychlému vyhynutí v důsledku podvýživy. Jednotlivé režimy jsou popsány níže.

Potravní režim	Charakteristika – doba na semínkách
1 x týdně	1 x týdně na 24 hod
2 x týdně	2 x týdně na 24 hod
1 hod denně	1 hod ve 24 hod
2 hod denně	2 hod ve 24 hod
3 hod denně	3 hod ve 24 hod
4 hod denně	4 hod ve 24 hod
Kontrola	Ad libitum

Pro každou skupinu ploštic jsem měla zavedeny protokoly, do kterých byl zaznamenán začátek pokusu, tedy den jejich přeměny na imaga, podávání a odebírání semínek, počet vajíček, doba, po kterou byly ploštice drženy na FR (food restriction), úmrtnost a případné neočekávané události (např. útěk, poranění, nemoc).

Při každém pokusu se dbalo na dodržování stejných časových period mezi podáváním a odebíráním potravy. Režimy se dodržovaly na různá časová období, viz. jednotlivé pokusy. Podávání a odebírání potravy probíhalo po celou dobu označenou jako doba na omezeném příjmu potravy. Vajíčka se počítala každý den v pracovním týdnu, ne už o víkendech.

Doba jednotlivých pokusů se pohybovala v rozmezí 4 – 5 měsíců. Dohromady byly

prováděny tři pokusy při omezeném příjmu potravy. První dva pokusy byly předběžné, abychom zjistili jaké režimy budou nejvhodnější. Proto u nich nebyl použit velký počet jedinců. U pokusu posledního jsme počet jedinců zvýšili, aby bylo možné přesnější statistické vyhodnocení.

	<b>Pokus 1</b>	<b>Pokus 2</b>	<b>Pokus 3</b>
<b>N ploštic ♀ ve skupině</b>	10	10	30
<b>Chov</b>	CHF29LD	CHF?LD	CHF16LD
<b>Potravní režimy</b>	1 x, 2 x týdně + kontrola	1, 2, 3, 4 hod denně + kontrola	2, 4 hod denně + kontrola
<b>Doba potrav. režimu</b>	Celý život	31 dní	65 dní
<b>Exkrementy</b>	měřeny	neměřeny	neměřeny

CH = původ vzorku (Chelčice)

F+číslo = počet generací v laboratorním chovu při dlouhém dnu (LD)

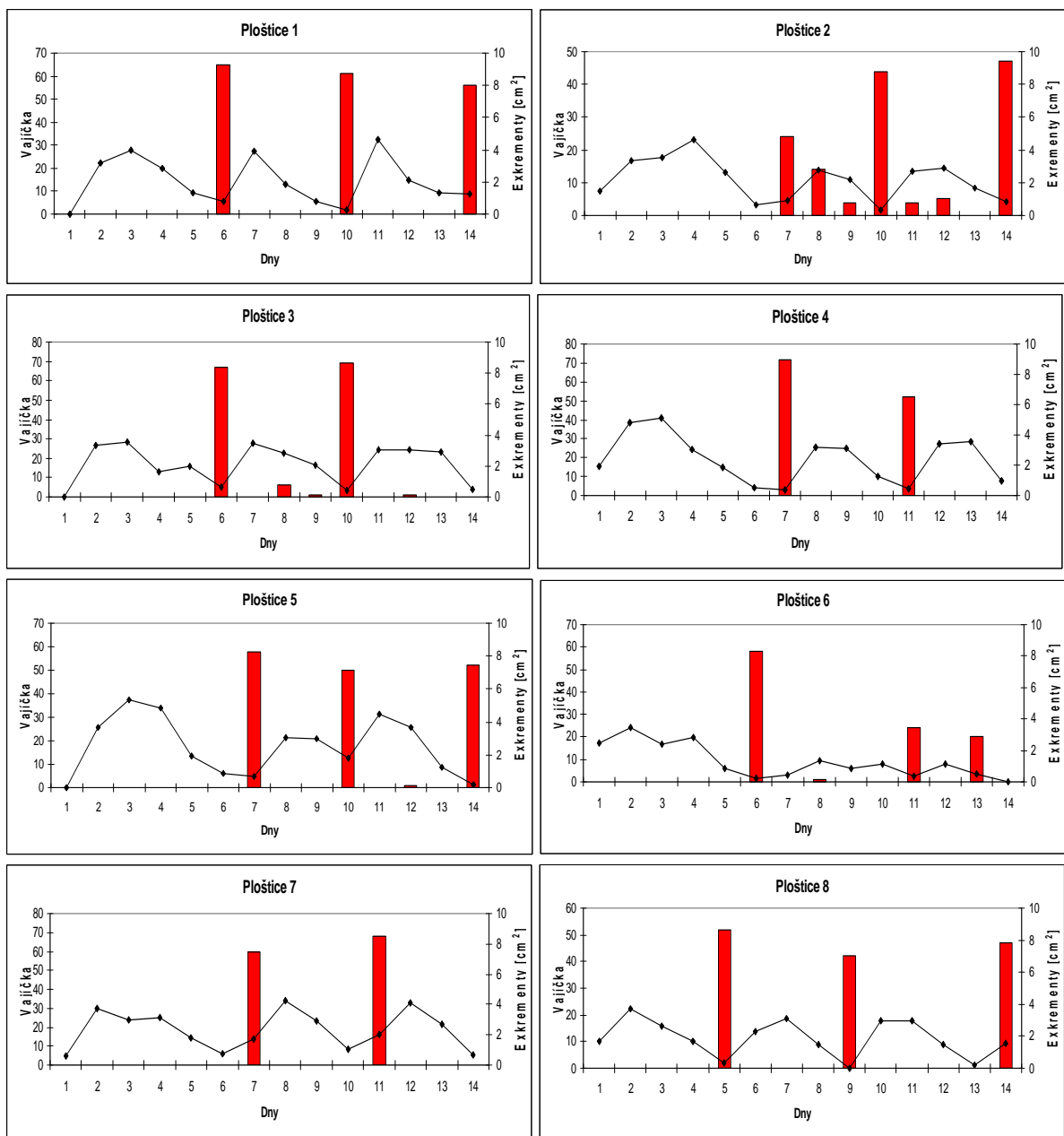
### 3.4 Grafické zpracování a statistika

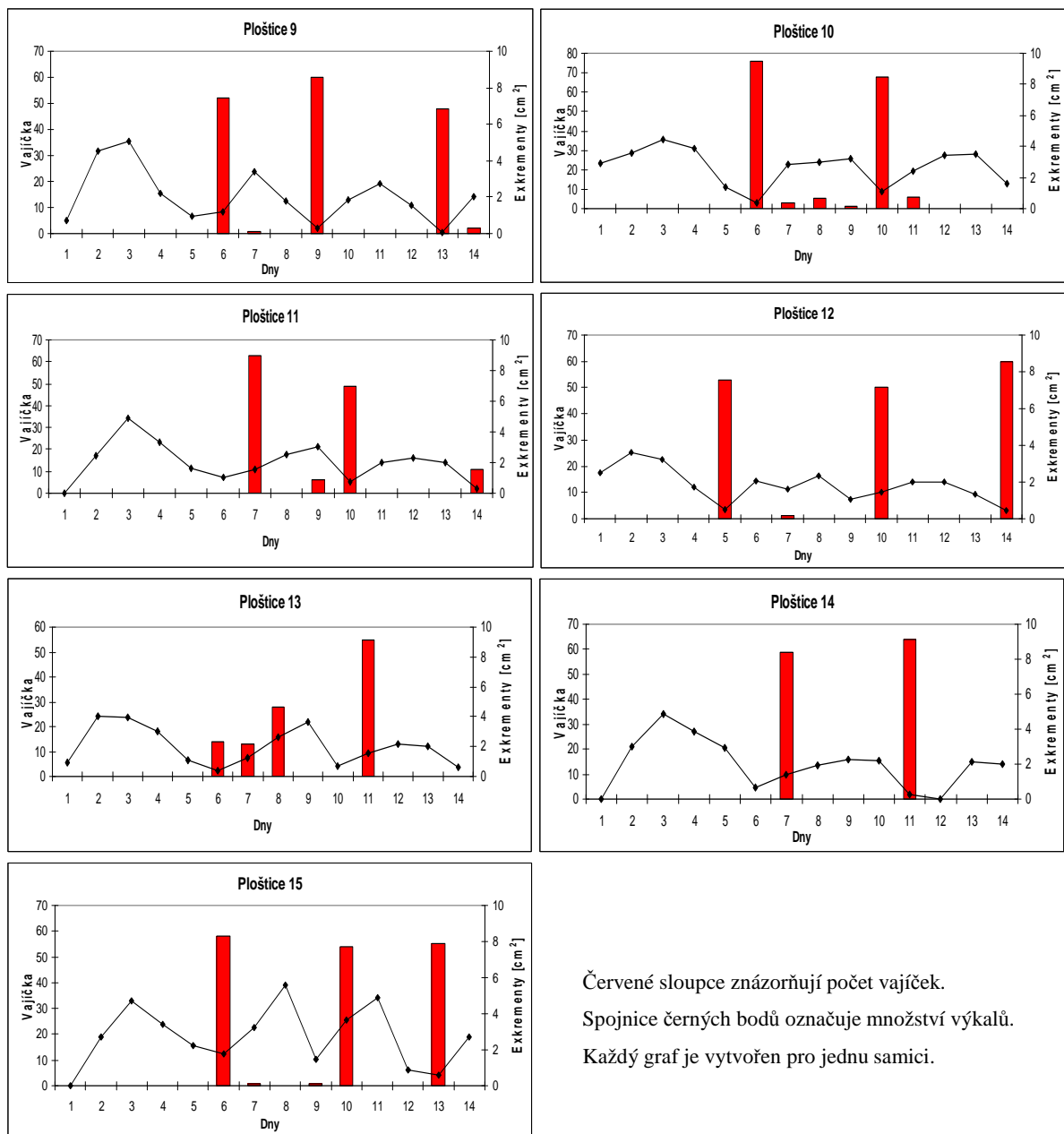
Na tvorbu grafů byly použity programy Open Office Calculator, Microsoft Excel a GrandPad Prism4. V jednotlivých grafech je vyobrazen průměr±SEM. Na statistické vyhodnocení bylo použito testů jednocestné ANOVY s Tukey post-testem. Long rank test byl použit na porovnání křivek přežívání mezi jednotlivými skupinami.

Ploštice, které utekly, nebo zemřely velmi brzy z důvodů nemoci či manipulace se do statistického vyhodnocení nezapočítávaly.

# 4 VÝSLEDKY

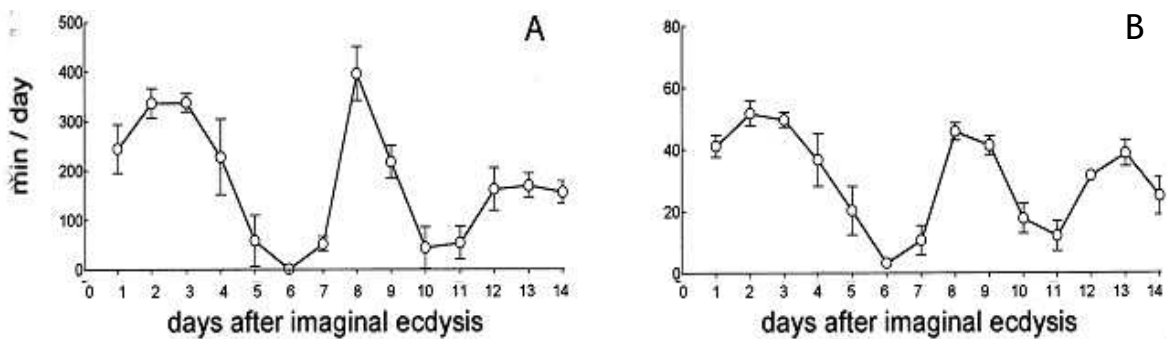
## 4.1 Příjem potravy během 2-3 reprodukčních cyklů měřený plochou exkrementů





Červené sloupce znázorňují počet vajíček.  
 Spojnice černých bodů označuje množství výkalů.  
 Každý graf je vytvořen pro jednu samici.

Obr. 2.: Příjem potravy během 2-3 reprodukčních cyklů u *Pyrrhocoris apterus*.

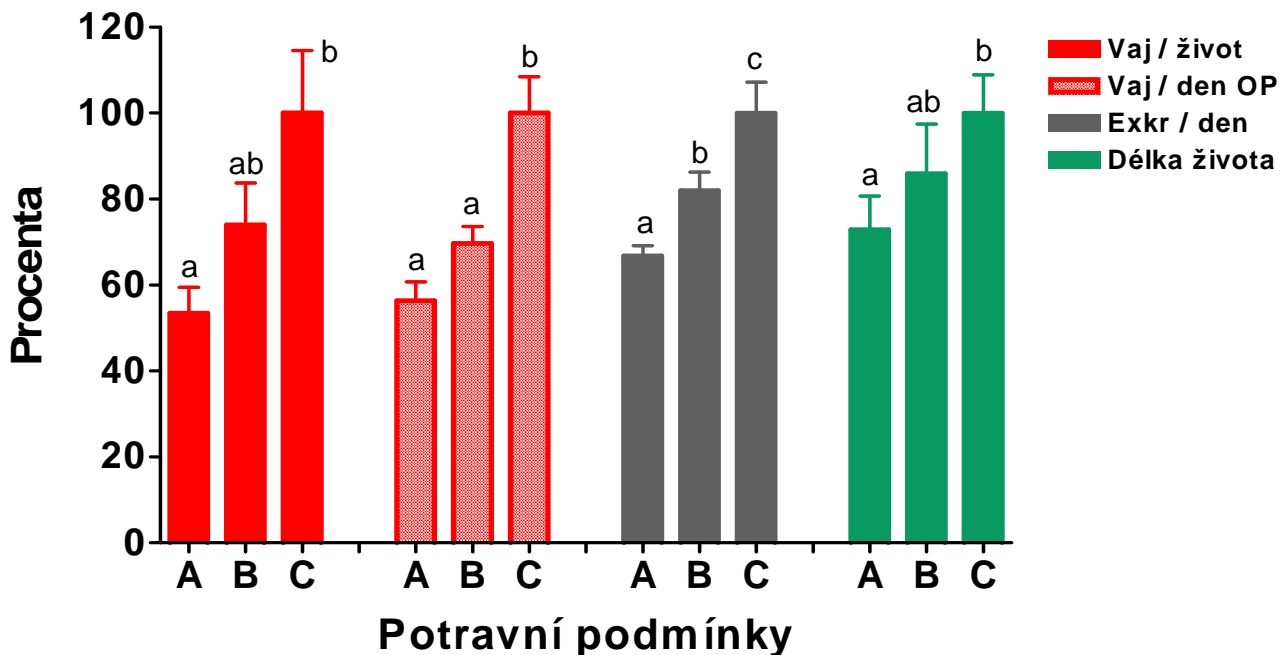


Obr. 3. Příjem potravy (A) a tekutin (B) u reproduktivních brachypterních samiček *P. apterus* podle Šuly et al. (1998). ¶

Grafy z obr. 2. znázorňují průběh příjmu potravy u 15 reproduktivních samiček *P. apterus*. Na většině grafů je vidět trend, kdy samička přestane přijímat potravu a posléze dojde k vykladení vajíček. Tyto výsledky jsem porovnávala s výsledky podle Šuly et al. z roku 1998, kde byla měřena aktivita příjmu potravy a tekutin u brachypterních reprodukčně aktivních samiček *P. apterus*.

Při srovnání můžeme vidět jasnou podobnost průběhu příjmů potravy a tekutin, což potvrzuje správnost použité metody měření příjmu potravy přes množství exkrementů.

## 4.2 Vliv omezeného příjmu potravy na produkci vajíček, množství exkrementů a délku života



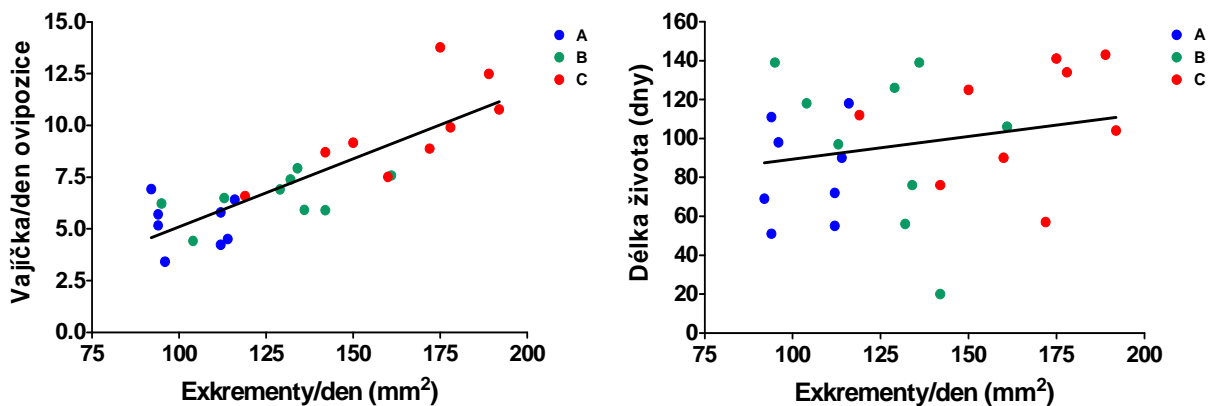
Obr.4.: Vliv omezeného příjmu potravy na produkci vajíček, množství exkrementů a délku života.

A – semínka 1x týdně na 24hod, B – semínka 2x týdně na 24 hod, C – semínka ad libitum, N = 8-10 pro každou skupinu

Rozdíl mezi průměry: Jednocestná ANOVA, Tukey post test. Signifikantně odlišné hodnoty jsou označeny různými písmeny nad sloupci.

Na těchto grafech vidíme vliv omezeného příjmu potravy na množství vajíček, množství exkrementů resp. množství přijaté potravy a délku života. Hodnoty kontrol (ad libitum)– C – byly brány jako 100%. Vidíme, že počet vajíček na den ovipozice je u skupin A (semínka 1x týdně) i B (semínka 2x týdně) signifikantně menší než u kontrol. Skupina A a B se v počtu vajíček na den ovipozice signifikantně neliší. Při porovnání s počtem vajíček za celý život se hodnota u skupiny B nachází mezi A a C. Při srovnání délky života s množstvím nakladených vajíček za život je patrné, že plošnice s omezeným příjmem potravy sice zkracovaly délku života, ale méně, než omezovaly počet nakladených vajíček.

### 4.3 Vztah mezi množstvím exkrementů, intenzitou kladení a délkou života



Obr.5.: A - Vztah mezi množstvím exkrementů a intenzitou kladení. B - Vztah mezi množstvím exkrementů a délkou života.

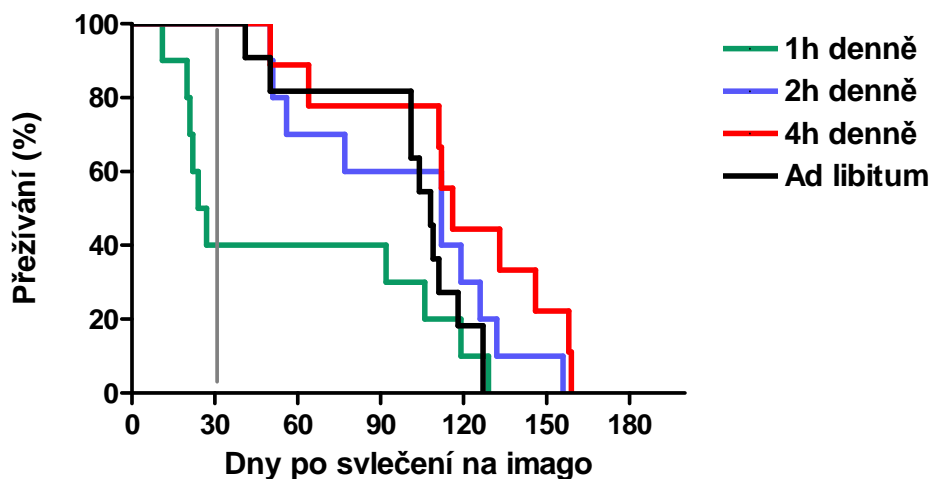
A – semínka 1x týdně na 24hod, B – semínka 2x týdně na 24 hod, C – semínka ad libitum

N = 26; A: Lineární regrese:  $r^2 = 0,69$   $P < 0,0001$ , B: Lineární regrese:  $r^2 = 0,05$   $P = 0,2753$  (NS)

Z grafů je vidět, že existuje poměrně silná korelace mezi množstvím výkalů resp. přijaté potravy a počtem nakladených vajíček ( $r^2 = 0,69$ ). Korelace mezi délkou života a množstvím přijaté potravy je velmi slabá a nesignifikantní. Z čehož vyplývá, že množství potravy nemá vliv na délku života u plošnice *P. apterus*, ale má vliv na množství nakladených vajíček.



#### 4.4 Vliv denního omezení příjmu potravy na délku života - předběžný pokus



Obr.6.: Vliv denního omezení příjmu potravy na délku života – předběžný pokus

Svislá čára označuje konec omezování příjmu potravy.

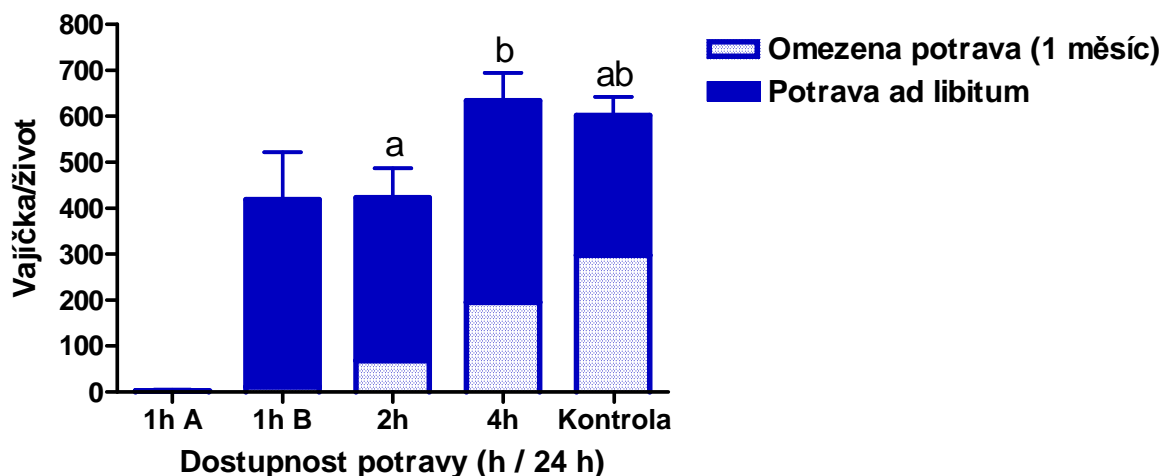
Medián: 1h=22,5 (N=10), 2h=112 (N=10), 4h=116 (N=9), ad lib=108 (N=11)

LONGRANK TEST: 2h vs ad lib  $P=0,3456$  (NS), 2h vs 4h  $P=0,02035$  (NS), 4h vs ad lib  $P=0,0445$ , skupina 1h nebyla hodnocena vzhledem k vysoké variabilitě

Tento pokus byl proveden jako předběžný s malým počtem pokusných zvířat (N=40). Při tomto pokusu byla potrava omezována od svlečení jedince na imago po dobu jednoho měsíce. Konec omezování příjmu potravy označuje svislá čára. U skupiny 1h denně vidíme velkou variabilitu v délce života, některé ploštice z této skupiny se nedožily neomezeného příjmu potravy a pokud se dožily, jejich délka života se příliš nelišila od kontrol ad libitum. Vidíme zde také, že pouze skupina 4h denně žila signifikantně déle než kontroly ad libitum ( $P=0,0445$ ).

Podle těchto výsledků se jeví vhodné na další pokus skupiny 2h a 4h denně. Omezení příjmu potravy na 1h denně se jeví jako podvýživa.

## 4.5 Vliv denního omezeného příjmu potravy na produkci vajíček - předběžný pokus



Obr.7.: Vliv denního omezeného příjmu potravy na produkci vajíček – předběžný pokus.

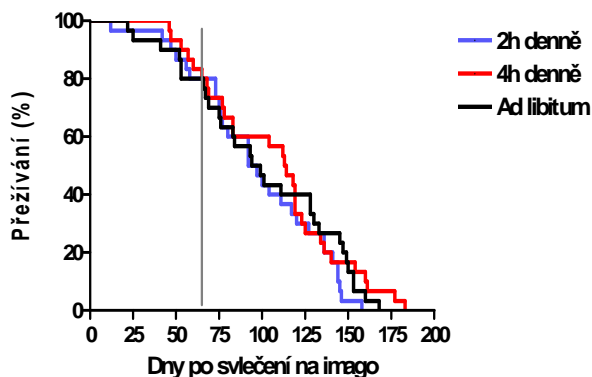
N=9-11 ve skupině

Rozdíl mezi průměry: Jednocestná ANOVA, Tukey post test. Signifikantně odlišné hodnoty jsou označeny různými písmeny nad sloupci. Skupina 1h nebyla vyhodnocována vzhledem k velké variabilitě (1hA:N=6 - nekladoucí samice; 1hB:N=4 - kladoucí samice).

U kontrol nikdy nedošlo k omezení příjmu potravy. Období omezeného příjmu potravy je označeno jen pro srovnání s ostatními skupinami.

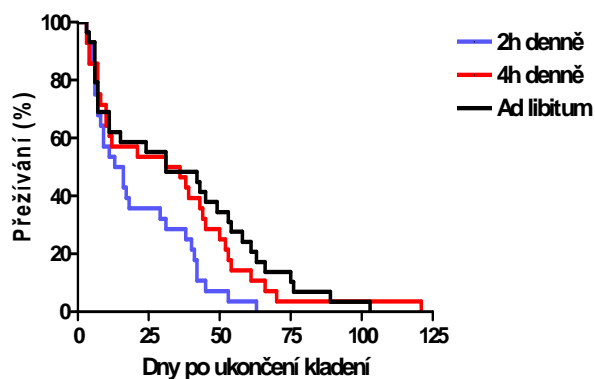
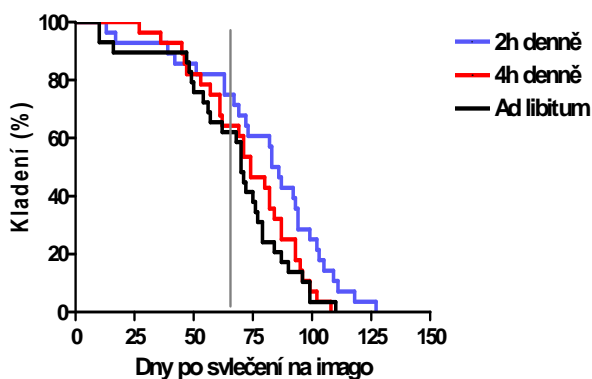
Z těchto grafů je patrné, že samice ploštic, držené jeden měsíc na omezeném příjmu potravy, kladly v období omezovaného příjmu potravy méně než kontroly ad libitum. Čím více byla potrava omezena, tím méně samice kladly. Skupina 1h byla velmi variabilní, a proto zde došlo k rozdělení na podskupiny A a B, kde skupina 1h A nezačala s kladením a skupina 1h B ano. Vidíme zde signifikantní rozdíl v počtu vajíček za život mezi skupinou 2h a 4h, i když průměrný počet vykladených vajíček byl u skupiny 2h nižší než u kontrol, tento rozdíl nevyšel signifikantně, zřejmě kvůli malému počtu jedinců a velké variabilitě.

## 4.6 Vliv denního omezení příjmu potravy na délku života, reprodukčního a postreprodukčního období



Obr. 8.: Vliv denního omezení příjmu potravy na délku života.

Svislá čára označuje konec omezování příjmu potravy. Medián: 2h= 94,5 (N=30), 4h= 113,5 (N=30), ad lib= 96,5 (N=30) Logrank Test: Křivky přežívání se signifikantně neliší (P= 0,4133)



Obr. 9.: Vliv denního omezení příjmu potravy na délku reprodukční aktivity.

Svislá čára označuje konec omezování příjmu potravy. Medián: 2h= 84,5 (N=28), 4h= 74,0 (N=28), Ad lib= 70,0 (N=29); Logrank Test: 2h vs Ad lib P=0,0155, 2h vs 4h P= 0,055 (marginálně NS), 4h vs ad lib P= 0,5527 (NS)

Obr. 10.: Vliv denního omezení příjmu potravy na délku post-ovipozice.

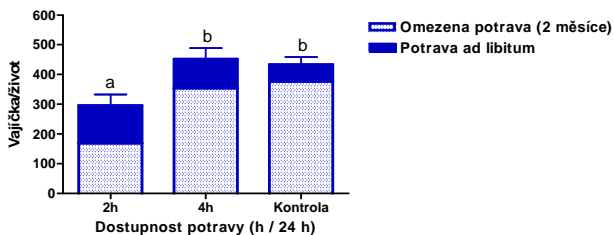
Medián: 2h= 11,5 (N=28), 4h= 33,5 (N=28), ad lib= 31,0 (N=29); Logrank Test: 2h vs ad lib P= 0,0078, 2h vs 4h P=0,00479, 4h vs ad lib P= 0,5358 (NS)

Obr. 8 již patří k třetímu pokusu, do kterého byly podle výsledků z předchozích pokusů vybrány skupiny 2h denně a 4h denně, které jak se zdálo nezkracovaly nebo prodlužovaly délku života viz obr.6. Bylo použito větší množství pokusných zvířat (N=90). Svislá čára zde opět značí konec denního omezování příjmu potravy, v tomto pokusu však byla potrava omezována po dvojnásobně delší dobu (65 dní) než v předběžném pokuse (31 dní). Z grafu vidíme, že délka života se mezi skupinami signifikantně neliší. Nedošlo tedy k potvrzení očekávání prodloužení délky života jako v pokusu předběžném. Překvapivě se zdá, že omezování příjmu potravy nemá na délku života plošnice vliv, pokud nedojde k podvýživě viz obr.6 skupina 1h denně.

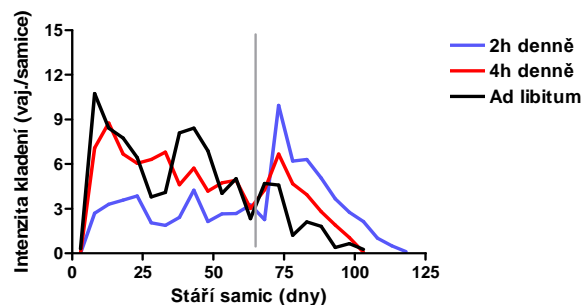
Na obr.9 je znázorněno množství kladoucích samic resp. kladení v průběhu dospělého života – dny po svlékání na imago. Svislá čára zde znázorňuje ukončení omezovaného příjmu potravy a přechod na ad libitum (po 65 dnech). Patrné je, že skupina 2h denně kladla déle, než ostatní dvě skupiny. Signifikantní je rozdíl mezi 2h denně a kontrolami ad libitum ( $P=0,0155$ ) a marginálně nesignifikantní mezi skupinami 2h denně a 4h denně. Skupina 4h denně kladla o trochu déle než kontroly, ale ze statistického pohledu se nejedná o významný rozdíl.

Na obr.10 je ukázána délka post-ovipozice (dny po ukončení kladení) u jednotlivých skupin. Patrný je rozdíl mezi skupinou 2h denně a ostatními dvěmi skupinami. Rozdíl vyšel signifikantní jak u 2h denně vs kontroly ad libitum ( $P=0,0078$ ) tak u 2h denně vs 4h denně ( $P=0,00479$ ). Skupina kontrol ad libitum a 4h denně se významně neliší. Skupina 2h denně měla reproduktivně aktivní období téměř celý život a zkrácení délky života bylo na úkor post-ovipozičního období.

## 4.7 Vliv denního omezeného příjmu potravy na produkci vajíček a intenzitu kladení



Obr.11.: Vliv denního příjmu potravy na produkci vajíček.  
N=28; Rozdíl mezi průměry: Jednocestná ANOVA, Tukey post test. Signifikantně odlišné hodnoty jsou označeny různými písmeny nad sloupci.



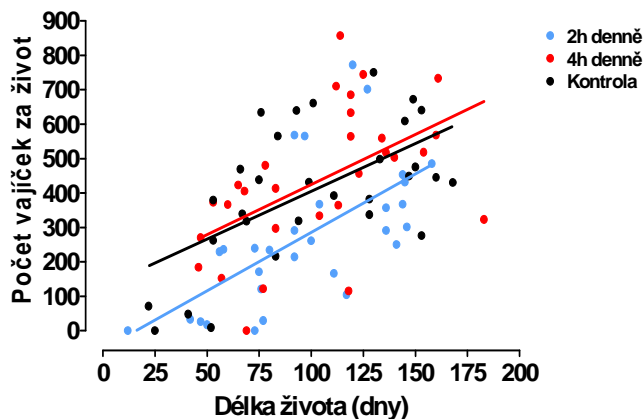
Obr.12.: Vliv denního příjmu potravy na intenzitu reprodukce.  
N= 30 (pro každou skupinu); Svislá čára označuje konec omezování příjmu potravy.

Obr.11 znázorňuje počet vajíček za život a zároveň množství vajíček při omezovaném příjmu potravy a po přechodu na ad libitum. Vidíme, že počet vajíček u kontrol a skupiny 4h denně se téměř neliší, i když u skupiny 4h denně je počet vajíček nepatrně vyšší. Skupina 2h denně nakladla v průměru signifikantně méně vajíček jak za život, tak během omezeného příjmu potravy než skupina 4h denně i kontroly ad libitum.

Na obr.12 jsou znázorněny změny v intenzitě reprodukce v průběhu reprodukčního období ploštice. U skupiny 2h denně je zajímavé, že intenzita se zvýšila na maximální hodnotu v okamžiku, kdy ploštice dostaly potravu ad libitum, tedy v době, kdy denní produkce vajíček u kontrol značně poklesla. Kontroly dosáhly maxima v začátku ovipozice. Skupina 4h denně také zvýšila produkci vajíček po přechodu na potravu ad libitum, ale maxima dosáhla na začátku ovipozice podobně jako kontroly ad libitum.

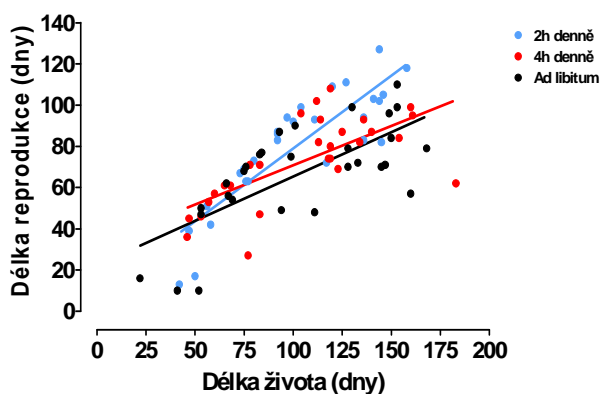
Zdá se, že snížený příjem potravy má vliv na intenzitu reprodukce u *P. apterus*. Kladení je omezeno tím více, čím více je redukována potrava. Pokud však vrátíme ploštici na potravu ad libitum zvyšuje reprodukci. Zvýšení reprodukce je však krátkodobé vzhledem k relativně malému prodloužení reprodukčního období (viz.obr 9).

## 4.8 Vztah mezi délkou života a reprodukcí



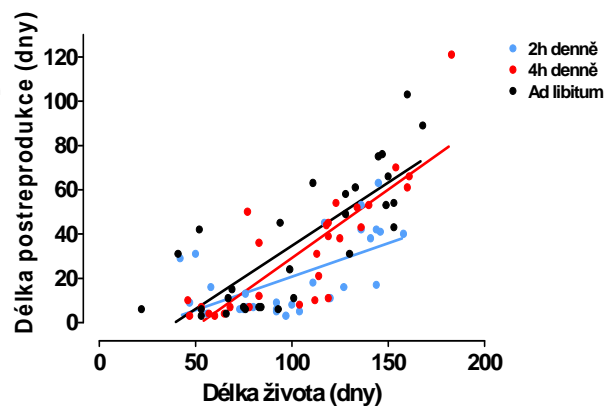
Obr. 13. Vztah mezi délkou života a produkcí vajíček.

Lineární regrese: 2h denně:  $r^2=0.39$   $P=0,0002$  ( $N=30$ ); 4h denně:  $r^2=0.28$   $P=0,0035$  ( $N=29$ ); ad lib:  $r^2=0,0005$   $P=0,0005$  ( $N=30$ ). Rozdíl mezi sklonem (slope) křivek není signifikantní.



Obr. 14. Vztah mezi délkou života a délkou reprodukčního období.

Lineární regrese: 2h denně:  $r^2=0,75$   $P<0,0001$  ( $N=28$ ); 4h denně:  $r^2=0,47$   $P<0,0001$  ( $N=28$ ); ad lib:  $r^2=0,50$   $P<0,0001$  ( $N=29$ ); Srovnání sklonu (slope) regresních křivek: 2h vs ad lib:  $F=5,60$   $DFn=1$   $DFd=53$   $P=0,02$ ; 2h vs 4h:  $F=8,20$   $DFn=1$   $DFd=52$   $P=0,006$ ; 4h vs ad lib:  $F=0,17$   $DFn=1$   $DFd=53$   $P=0,68$  (NS)



Obr. 15. Vztah mezi délkou života a délkou post-ovipozice.

Lineární regrese: 2h denně:  $r^2=0,36$   $P=0,0008$  ( $N=28$ ); 4h denně:  $r^2=0,73$   $P<0,0001$  ( $N=29$ ); adlib:  $r^2=0,64$   $P<0,0001$  ( $N=29$ ); Srovnání sklonu (slope) regresních křivek: 2h vs ad lib:  $F=5,30$   $DFn=1$   $DFd=53$   $P=0,025$ ; 2h vs 4h:  $F=9,88$   $DFn=1$   $DFd=53$   $P=0,003$ ; 4h vs ad lib:  $F=0,51$   $DFn=1$   $DFd=54$   $P=0,48$  (NS)

Obr.13 znázorňuje vztah mezi délkou života a produkcí vajíček za život samice plošnice *P. apterus*. U všech sledovaných skupin byla pozitivní korelace mezi délkou života a množstvím vyprodukovaných vajíček.

Na obr.14 je vztah mezi délkou života a délkou ovipozice. Silná pozitivní korelace ( $r^2=0,75$ ) je u skupiny 2h denně. Naznačuje nám to, že plošnice skupiny 2h denně jsou téměř celý život reprodukčně aktivní.

U obr.15. vidíme vztah délky života a post-ovipozice. Zde vyšly poměrně silné pozitivní korelace jak u kontrol ad libitum ( $r^2=0,64$ ), tak u skupiny 4h denně ( $r^2=0,74$ ). U skupiny 2h denně je korelace slabá. Naznačuje nám to, že délka života u kontrol a u skupiny 4h denně je více ovlivněna délkou post-reprodukčního období než u skupiny 2h denně.

Z výsledků je patrné, že omezený příjem potravy nemá vliv na délku života u samic *P. apterus*. Omezený potravní režim snižuje produkci vajíček, ale po přechodu na potravu ad libitum začnou plošnice klást více a také déle. Plošnice s potravním režimem 2h denně prodloužily dobu reprodukčního období na úkor poreprodukčního období. Důvodem může být snaha o kompenzaci snížené reprodukce v období omezeného příjmu potravy, ale je zde limitace reprodukčním stárnutím, které zřejmě probíhá i při snížené produkci vajíček. U plošnice *P. apterus* tedy nedochází k typickému trade-off mezi délkou života a reprodukcí.

## 5 DISKUZE

Studovala jsem vliv několika potravních režimů na délku života a reprodukční parametry u samic plošnice ruměnice pospolné *P. apterus*. Potrava byla omezována dobou, po kterou k ní plošnice měly přístup. Ve třech z pěti potravních režimů (1x týdně 24 h, 2x týdně 24 h, 1x denně 2 h) byla zřetelně snížena intenzita reprodukce (počet vajíček / den reprodukčního období), zatímco život byl buď kratší nebo se nelišil od kontrolních samic (ad libitum). Při intenzivnějším omezení dostupnosti potravy (1x denně 1 h) je u většiny samic produkce vajíček zcela potlačena a délka života výrazně zkrácena. U *P. apterus* se tedy neprojevil typický trade-off, kdy je snižená produkce vajíček spojena s prodloužením života. Je však zřejmé, že *P. apterus* při omezeném přísunu potravy upřednostňuje zachování délky života na úkor snížení reprodukce.

Protože doba přístupu k potravě nemusí nutně ukazovat množství přijaté potravy, v jednom pokusu jsem zjišťovala vztah délky života a produkce vajíček k množství exkrementů u jednotlivých samic. Ukázalo se, že je jasná pozitivní korelace mezi množstvím exkrementů a intenzitou reprodukce, zatímco nebyl žádný vztah mezi množstvím exkrementů a délkou života. Zdá se tedy, že při omezeném příjmu potravy je do údržby buněk investováno vždy podobné množství energie, čímž se nemění délka života. Potom na reprodukci jako by se přidělilo zbývající množství energie určené množstvím přijaté potravy. Alternativní vysvětlení je, že nižší reprodukce může způsobit méně škod, takže stačí méně energie na opravy a údržbu buněk.

Z mechanického pohledu je alokace množství energie mezi reprodukcí a údržbou buněk, resp. dlouhověkostí při omezeném příjmu potravy, zdá se, řízena IIS signálními drahami (Partridge et al. 2005). Avšak některé mutace v IIS u hád'átka mohou prodloužovat život aniž by omezovaly reprodukci (Gems et al. 1998, Dillin et al. 2002). Přímé zásahy do hád'átka odstraněním různých částí reprodukčních orgánů vedlo také k zajímavým zjištěním. Odstranění buněk zárodečné linie prodlužuje délku života. Je možné, že prezence buněk zárodečné linie je energeticky náročná, ale odnětí celých gonád, obsahujících jak somatické buňky, tak buňky zárodečné linie, nemělo na délku života žádný vliv. Spíše, než aby byly buňky zárodečné linie energeticky náročné, vysílají nějaké signály, které mají negativní vliv na délku života a naopak somatické buňky gonád produkují signály s efektem opačným.



Konečný vliv je tedy vykrácen (Hsin a Kenyon 1999). U *D. melanogaster* odstranění zárodečných buněk buď zkracuje (Barnes et al. 2006) nebo prodlužuje délku života (Flatt et al. 2008).

Tyto pokusy zpochybňují existenci trade-off mezi produkcí vajíček a délkou života. U *P. apterus*, podobně jako u háďátka, nemá vyjmutí celých gonad vliv na délku života (Hodková 2008). Avšak odstranění corpus allatum, které produkuje juvenilní hormon, prodlužuje život. Allatektomie brání syntéze žlutkových proteinů tukovým tělesem. Příjem potravy stimuluje produkci juvenilního hormonu (Hodková et al. 2001). Je možné, že vzájemný vztah mezi příjmem potravy a délkou života je u *P. apterus* skrze působení juvenilního hormonu na tukové těleso a ne na zrání vajíček. Zachování délky života při omezeném příjmu potravy by pak bylo způsobeno buď sníženým množstvím energie investované do produkce žlutkových proteinů nebo sníženou škodlivostí metabolických procesů v tukovém tělese.

Z evolučního hlediska je trade-off mezi délkou života a reprodukcí určitým přizpůsobením na periodický nedostatek potravy (Partridge et al. 2005). Kaitala (1991) se domnívá, že stálost či nestálost životního prostředí a počet generací má vliv na délku života a reprodukci při omezeném příjmu potravy u bruslařek (*Gerris*). Pokud je životní prostředí stálé a počet generací vzrůstající, samičky mají tendenci udržet si poměrně vysokou investici energie do reprodukce při omezení potravy, i když to vede ke snížení délky života. U nepředpovědatelného (nestálého) životního prostředí při snížení příjmu potravy samičky redukuje reprodukci a tak si udržují dlouhé reprodukční období. *P. apterus* žije v prostředí, kde má zajištěný stálý přísun potravy. Přesto samice reagují na snížený přísun potravy snížením reprodukce. Pokud je samicím udržovaným při omezené dostupnosti potravy po dobu 2 měsíců podána potrava ad libitum, intenzita reprodukce se zvýší a část vajíček, která by byla vykladena v mladším věku je vykladena ve věku, který by jinak byl post-reprodukční. Prodloužení reprodukčního období je však jen malé a nestačí kompenzovat sníženou produkci vajíček v období potravního omezení. Skutečnost, že omezení příjmu potravy neprodlužuje dostatečně reprodukční období zřejmě souvisí s tím, že reprodukční potenciál se snižuje pouhým stárnutím i při snížené produkci vajíček. Při této reprodukční strategii by nebylo výhodné prodloužovat život, protože prodloužení života by pouze vedlo k prodloužení post-reprodukčního období a nezvyšovalo by produkci potomstva. Podobný

pokles reprodukčního potenciálu při omezené dietě byl pozorován u *Ceratitis capitata* (Carey et al. 2002b). U tohoto druhu je, podobně jako u *P. apterus*, prodlouženo reprodukční období na úkor post-reprodukce, zatímco délka života není ovlivněna pokud není dietní omezení příliš drastické (Carey et al. 2002a).

Vztah mezi omezeným příjmem potravy a délkou života je u primátů a u lidí mnohem méně prostudován. Již dlouho běží pokus na makaku rhesus, jehož průběžné výsledky naznačují, že CR zřejmě zpomaluje některé se stárnutím spojené fyziologické procesy (Ramsey et al. 2000).

U lidí se situace posuzuje mnohem hůře, ale zajímavý experiment byl proveden s osmi lidmi, kteří se na dva roky dali zavřít do, řekněme vlastního světa. Byl jim omezen příjem potravy a to, co řekly výsledky se vesměs shodovalo s výsledky provedenými na pokusných zvířatech. Přesněji došlo k podobným fyziologickým, hormonálním a biochemickým změnám jako u hlodavců a opic držných na podobné dietě (Walford et al. 2002).

## 6 ZÁVĚR

- Omezený příjem potravy nemá vliv na délku života samic *Pyrrhocoris apterus*
- Omezený příjem potravy snižuje celoživotní produkci vajíček a intenzitu reprodukce
- Samice po přechodu na potravu ad libitum zvyšují intenzitu reprodukce
- Omezený příjem potravy prodlužuje reprodukční období na úkor po-reprodukčního období
- Schopnost reprodukce stárnutím klesá i při omezeném příjmu potravy
- U *P. apterus* se neprojevil trade-off mezi délkou života a plodností

## 7 SEZNAM LITERATURY

- Abrams P. A. 1991. *The fitness costs of senescence: The evolutionary importance of events in early adult life*. Evolutionary Ecology 5: 343–360, podle Ricklefs 1998
- Bahar R., Hartman C.H., Rodriguez K.A., Denny A.D., Busuttill R.A., Dollé M.E.T., Caler R.B., Chisholm G.B., Pollock B.H., Klein Ch. A., Vijg J. 2006. *Increased cell-to-cell variation in gene expression in ageing mouse heart*. Nature 441(7096): 1011-1014.
- Barnes A.I., Partridge L. 2003. *Costing reproduction*. Animal Behaviour 66: 199-204.
- Barnes A.I., Boone J.M., Jacobson J., Partridge L., Chapman T. 2006. *No extension of lifespan by ablation of germ line in Drosophila*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 102: 3105-3110. podle Hodkova 2008
- Bourg E.L., Minois N. 2005. *Does dietary restriction really increase longevity in Drosophila melanogaster?* Aging Research Reviews 4: 409-421.
- Boveris A., Chance B. 1973. *The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen*. Biochemical Journal 134: 707-716.
- Brand M.D., Murphy M.P. 1987. *Control of electron flux through the respiratory chain in mitochondria and cells*. Biological Reviews 62: 141-193.
- Britton J.S., Lockwood W.K., Li L., Cohen S.M., Edgar B. 2002. *Drosophila's Insulin/PI3-Kinase Pathway Coordinates Cellular Metabolism with Nutritional Condition*. Developmental Cell 2: 239-249. podle Partridge et al. 2005
- Carey J.R., Liedo P., Harshman L., Zhang Y., Muller H.G., Partridge L., Wang J.L. 2002a. *Life history response of Mediterranean fruit flies to dietary restriction*. Aging cell 1: 140-148.
- Carey J.R., Liedo P., Harshman L., Liu X., Muller H.-H., Partridge L., Wang J.-L. 2002b. *Food pulses increase longevity and induce cyclical egg production in Mediterranean fruit flies*. Functional Ecology 16:313-325.
- Clancy D.J., Gems D., Hafen E., Leevers S.J., Partridge L. 2002. *Dietary Restriction in Long-Lived Dwarf Flies*. Science 296:319
- Clancy D.J., Gems D., Harshman L.G., Oldham S., Stocker H., Hafen E., Leevers S.J., Partridge L. 2001. *Extension of Life-Span by Loss of CHICO, a Drosophila Insulin Receptor Substrate Protein*. Science 292: 104-106
- Colombani J., Raison S., Pantalacci S., Radimerski T., Montagne J., Leopold P. 2003. *A Nutrient Sensor Mechanism Controls Drosophila Growth*. Cell 114: 739-749. podle Partridge et al. 2005
- Cooper T.M., Mockett R.J., Sohal B.H., Sohal R.S., Orr W.C. 2004. *Effect of caloric restriction of the housefly,*

- Musca domestica*. FASEB J.,online 10.1096/fj03-1464fje.
- Dillin A., Crawford D.K., Kenyon C. 2002. *Timing Requirements for Insulin/IGF-1 Signaling in C.elegans*. Science 298: 830-834.
- Finch C.E.1990. *Longevity, Senescence, and the Genome*. Chicago: Univ. Chicago Press, podle Ricklefs 1998
- Flatt T., Min K.-J., D'Alterio C., Villa-Guesta E., Cumbers J., Lehmann R., Jones D.L., Tatar M. 2008. *Drosophila germ-line modulation of insulin signaling and lifespan*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 105: 6368-6373.
- Forster M.J., Morris P. a Sohal R.S. 2003. *Genotype and age influence the effect of caloric intake on mortality in mice*. FASEB J 17:690-692. podle Forster et al. 2003
- Forster M.J., Morris P., Sohal R.S. 2003. *Genotype and age influence the effect of caloric intake on mortality in mice*. FASEB J 17: 690–692.
- Gems D., Sutton A.J., Sundermeyer M.L., Albert P.S., King K.V., Edgley M.L., Larsen P.L., Riddle D.L. 1998. *Two Pleiotropic Classes of daf-2 Mutation Affect Larval Arrest, Adult Behavior, Reproduction and Longevity in Caenorhabditis elegans*. Genetics 150: 129-155. podle Patridge 2005
- Gredilla R., Barja G. 2005. *Minireview: The Role of Oxidative Stress in Relation to Caloric Restriction and Longevity*. Endocrinology 146(9): 3713-3717
- Haldane J.B.S. 1941. *New Paths in Genetics*. London: Allen & Unwin, podle Weinert a Timiras 2003
- Harman D. 1956. *Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry*. Journal of. Gerontology. 11: 298-300.
- Harman D. 1972. *The biologic clock: the mitochondria?* Journal of Americam Geriatric Society 20: 145-147.
- Hodkova M. 1982. *Interaction of feeding and photoperiod in regulation of the corpus allatum activity in femalrs of Pyrrhocoris apterus L. (Hemiptera)*. Zoologische Jahrbucher Physiologie 86: 477-488.
- Hodková M., 2008. *Tissue signaling pathways in the regulation of life-span and reproduction in females of the linden bug, Pyrrhocoris aперus*. Journal of Insect Physiology 54: 508-517.
- Hodkova M., Okuda T., Wagner R. 2001.*Regulation of corpora allata in females of Pyrrhocoris apterus (Heteroptera) (a mini-review)*. In Vitro Cellular and Molecular biology - Animal 37: 560-563.
- Holmes D. J., Austad S. N. 1995a. *The Evolution of Avian Senescence Patterns: Implications for Understanding Primary Aging Processes*. American Zoologist 35: 307–317, podle Ricklefs 1998
- Holmes D.J., Austad S.N. 1995b. *Birds as animal models for the comparative biology of aging: a prospectus*. Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences, 50: B59-B66
- Hsin H., Kenyon C. 1999. *Signals from the reproductive system regulate the life span of C.elegans*. Nature 399:

- 362-366. podle Partridge 2005
- Hughes K.A., Reynolds R.M. 2005. *Evolutionary and Mechanistic Theories of Aging*, Annual Review of Entomology 50: 421-45
- Jiang J.C., Wawryn J., Shantha Kumura H.M., Jazwinski S.M. 2002. *Distinct roles of processes modulated by histone deacetylases Rpd3, Hda1p and Sir2p in life extension by caloric restriction in yeast*. Experimental Gerontology 37: 1023-1030. podle Partridge et al. 2005
- Kaeberlein M., Kirkland K.T., Fields S., Kennedy B.K.. 2004. *Sir2-Independent Life Span Extension by Calorie Restriction in Yeast*. Plos Biology 2. E296. podle Partridge et al. 2005
- Kaitala A. 1991. *Phenotypic plasticity in reproductive behaviour of waterstridres: trade-offs between reproduction and longevity during food stress*. Functional Ecology 5: 12-18
- Kapahi P., Zid B.M., Harper T., Koslover D., Sapin V., Benzer S. 2004. *Regulation of lifespan in Drosophila by modulation of genes in the TOR signaling pathway*. Current Biology 14:885-890. podle Partridge et al. 2005
- Kenyon C., Chang J., Gench E., Rudner A., Tabtiang R. 1993. *A C. elegans mutant that lives twice as long as wild type*. Nature 366: 461-464
- Kirk K.L. 2001. *Dietary Restriction and Aging: Comperative Test of Evolutionary Hypotheses*. Journals of Gerontology Series A-Biological Sciences and Medical Sciences 56(3): B123-B129.
- Kirkwood T.B.L. 1977. *Evolution of aging*. Nature 270: 301–304.
- Kirkwood T.B.L. 2002. *Evolution of aging*. Mechanisms of Aging and Development 123(7): 737-745
- Kristal B.S. a Yu B.P. 1992. *An emerging hypothesis: Synergistic induction of aging by free radicals and Maillard reactions*. Journals of Gerontology. 47: B107-B114
- Le Bourg E. 2001. *A mini-review of the evolutionary theories of aging. Is it the time to accept them?* Demographic Research 4, Article 1.
- Lee K.P., Simpson S.J., Clissold F.J., Brooks R., William J., Ballard O., Taylor P.W. 2008. *Lifespan and reproduction in Drosophila: New insights from nutritional geometry*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. 105: 2498-2503
- Lin S.J., Defossez P.A., Guarante L. 2000. *Requirement of NAD and SIR2 for Life-Span extension by Calorie Restriction in Saccharomyces cerevisiae*. Science 289: 2126-2128. podle Partridge et al. 2005
- Lin Y.-J., Seroude L., Benzer S. 1998. *Extended life-span and stress resistance in the Drosophila mutant methuselah*. Science 282: 943-946
- Marden J.H., Rogina B., Montooth K.L., Helfand S.L. 2003. *Conditional tradeoffs between between aging and organismal performance of Indy long-lived mutant flies*. Proceedings of the National Academy of

- Sciences of the USA 100: 3369-3373. podle Partridge et al. 2005
- Martinez D.E. 1998. *Mortality Patterns Suggest Lack of Senescence in Hydra*. Experimental Gerontology 33: 217–225.
- Martinez-Vicente M., Sovak G. a Cuervo A.M. 2005. *Protein degradation and aging*. Experimental Gerontology 40: 632-633.
- Masoro E.J. 1988. *Food restriction in rodents an evaluation of its role in the study of aging*. Journals of Gerontology 43: B59-B64.
- Masoro E.J. 2002. *Caloric Restriction: a Key to Understanding and Modulating Aging*. Elsevier, Amsterdam podle Masoro 2005
- Masoro E.J., Iwasaki K., Gleiser C.A., McMahan C.A., Seo E., Yu B.P. 1989. *Dietary modulation of the progression of nephropathy in aging rats: An evaluation of the importance of protein*. American Journal of Clinical Nutrition 49 (1): 217-1227
- Medawar P.B. 1952. *An Unsolved Problem of Biology*. London:Lewis, podle Weinert a Timiras 2003
- Mockett R.J., Cooper T.M., Orr W.C., Sohal R.S. 2006. *Effects of caloric restriction are species-specific*. Biogerontology 7: 157-160.
- Orentreich N., Matias J.R., DeFelice A., Zimmerman J.A. 1993. *Low methionine ingestion by rats extends life span*. J Nutr 123: 269–274.
- Partridge L. a Brand N.D. 2005. *Special issue on dietary restriction: Dietary restriction, longevity and aging - the current state of our knowledge and ignorance*. Mechanisms of Aging and Development 126: 911-912.
- Partridge L., Gems D. a Withers D.J. 2005. *Sex and death: What is the connection?* Cell 120: 461-472.
- Perez-Campo R., Lopez-Torres M., Cadenas S., Rojas C., Barja G. 1998. *The rate of free radical production as a determinant of the rate of aging: evidence from the comparative approach*. Comparative Physiology B 168: 149-58
- Ramsey J.J., Colman R.J., Binkley N.C., Christensen J.D., Gresl T.A., Kemnitz J.W. a Weindruch R. 2000. *Dietary restriction and aging in rhesus monkeys: the University of Wisconsin study*. Experimental Gerontology 35: 1131-1149
- Ricklefs R.E.1998. *Evolutionary theories of aging: confirmation of a fundamental prediction, with implications for the genetic basis and evolution of life span*. American Naturalist 152: 24-44
- Rogina B., Reenan R.A., Nilsen S.P., Helfand S.L.2000. *Extended Life-Span Conferred by Cotransporter Gene Mutation in Drosophila*. Science 290: 2137-2140. podle Partridge et al.2005
- Rose M.R. 1991. *The Evolutionary Biology of Aging*. Oxford Univ. Press, podle Ricklefs 1998

- Sanz A., Caro P., Barja G. 2004. *Protein restriction without strong caloric restriction decreases mitochondrial oxygen radical production and oxidative DNA damage in rat liver*. Journal of Bioenergetics and Biomembranes 36: 545–552.
- Suji G. a Sivakami S. 2004. *Glucose, glycation and aging*. Biogerontology 5: 365–373.
- Tatar M., Kopelman A., Epstein D., Tu M.-P., Yin C.-M., Garofalo R.S. 2001. *A mutant Drosophila insulin receptor homolog that extends life-span and impairs neuroendocrine function*. Science 292: 107-110.
- Walford R.L., Mock D., Verdery R., MacCallum T. 2002. *Calorie restriction in biosphere 2 (Alteration in physiologic, hematologic, hormonal and biochemical parameters in humans restricted for a 2-Year Period)*. The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences 57: B211-B224 (2002)
- Weindruch R., Walford R.L. 1982. *Dietary restriction in mice beginning at 1 year of age: effect on life-span and spontaneous cancer incidence*. Science 215: 1415-1418
- Weindruch R., Kayo T., Lee C.K., Prolla T.A. 2001. *Microarray profiling of gene expression in aging and its alteration by caloric restriction in mice*. American Society for Nutritional Sciences, 131(3): 918S-923S.
- Weindruch R., Keenan K.P., Carney J.M., Fernandes G.M., Feuers R.J., Floyd R.A., Halter J.B., Ramsey J.J., Richardson A., Roth G.S. a Spindler S.R. 2001. *Caloric restriction mimetics: Metabolic interventions*. Journals of Gerontology: Vol. 56A (Special Issue I): 20–33.
- Weinert B.T. a Timiras P.S. 2003. Invited Review: Theories of aging, Journal of Applied Physiology 95: 1706–1716, 2003;10.1152/jappphysiol.00288.2003
- Weismann A. 1891. *Essays Upon Heredity and Kindred Biological Problems*. Clarendon Press.
- Williams G.C. 1957. *Pleiotropy, Natural Selection and the Evolution of Senescence*. Evolution 11: 398-411.