

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
BAKALÁŘSKÁ DIPLOMOVÁ PRÁCE

**ADIPOKINETICKÝ HORMON A STRES VYVOLANÝ
INSEKTICIDEM U *LOCUSTA MIGRATORIA***

DANIELA KUCHYŇOVÁ

2009

DOC. RNDr. DALIBOR KODRÍK, CSc.

BAKALÁŘSKÁ DIPLOMOVÁ PRÁCE

Kuchyňová Daniela, 2009:

Adipokinetický hormon a stres vyvolaný insekticidem u saranče *Locusta migratoria* (Adipokinetic hormones and a stress elicited by insecticide permethrin in the locust *Locusta migratoria*).

Bachelor thesis, Faculty of Biological Sciences. The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

ANNOTATION:

Injection of insecticide permethrin into the locust *Locusta migratoria* evoked 24 h after the treatment increasing of adipokinetic hormones (AKH) level in the body. The increasing has been recorded both in the corpora cardiaca and in haemolymph. The increasing of all three locust AKHs was not uniform; the highest one has been recorded for Locmi-AKH-III.

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 – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných přírodovědeckou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně, pouze s použitím uvedené literatury a rad školitele.

V Českých Budějovicích, 2009

Daniela Kuchyňová

Za vznik této práce bych chtěla poděkovat hlavně mému školiteli Daliborovi Kodříkovi, za jeho obrovskou trpělivost a ochotu. Také Ivě Bártů za její rady a pomoc v laborce. Celé své rodině za jejich podporu a pochopení během mého studia. Také všem svým přátelům v mém okolí a svému partnerovi Kubovi.

OBSAH

ÚVOD	1
CÍLE PRÁCE	4
MATERIÁL, METODY STUDIA	4
-Pokusná zvířata	4
-Aplikace insekticidu	4
-Odběr hemolymfy	5
-Pitva CC	5
-Extrakce adipokinetických hormonů a jejich pre-purifikace na kolonce c-18	5
-Stanovení hladiny AKH-I v CC (RP HPLC)	6
-Stanovení AKH-I v CC pomocí metody ELISA	6
-Stanovení AKH-I v hemolymfě ELISA testem	8
STATISTICKÉ VYPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ	8
VÝSLEDKY	9
DISKUSE	13
ZÁVĚR	15
SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY	16

ÚVOD

V moderním zemědělství se začínají používat látky, které méně zatěžují životní prostředí a dochází k postupnému omezování klasických insekticidů. Jedním z perspektivních způsobů náhrady těchto insekticidů může být použití hmyzích neuropeptidů. Neuropeptidy mohou být využívány jako cílené zásahy proti škodlivým druhům hmyzu (Rayne a Oshea, 1997; Hoffmann a Lorenz, 1998; Roeder, 1999; Gäde a Goldworhy, 2003). Takový způsob kontroly populací hmyzích škůdců spočívá v narušení mechanismů, které jsou zodpovědné za syntézu, sekreci a transport neuropeptidů nebo ovlivnění jejich fyziologických funkcí.

Vhodnými kandidáty pro tento účel jsou hmyzí stresové hormony, jelikož stresové situace jako hladovění, infekce, zranění a intenzivní pohyb způsobují těžký metabolický stres. Podobné stresové zátěži je hmyz vystaven po ošetření insekticidem, kdy musí mobilizovat své energetické zásoby a eliminovat nebo snižovat dopad daného stresu na své fyziologické a další funkce. Hmyzí metabolismus je převážně kontrolován adipokinetickými hormony (AKH), které patří k AKH/RPCH peptidické rodině (Adipokinetic Hormone/Red Pigment Concentrating Hormone family). Všeobecně se tyto hormony chovají jako typicky stresové hormony, tím že stimulují katabolické reakce (mobilizace lipidů, cukrů a některých aminokyselin) a inhibují syntetické reakce.

AKH byly identifikovány u řady zástupců všech významných hmyzích řádů (Gäde a kol., 1997). Skládají se z 8–10 aminokyselin s N-koncem blokovaným kyselinou pyroglutamovou a C-koncem amidovaným. Výjimku tvoří babočka bodláková (*Vanessa cardui*), u které byl objeven AKH skládající se z 11 aminokyselin (Köllisch a kol., 2000). AKH se syntetizují a ukládají v corpora cardiaca (CC), což je neurohemální orgán umístěný v blízkosti mozku nasedající na aortu. Z CC jsou AKH uvolňovány do hemolymfy. U některých hmyzích zástupců (např. *Locusta migratoria* a *Pyrrhocoris apterus*) se buňky syntetizující AKH vyskytují i v mozku samotném (Schooneveld a kol., 1985; Bray a kol., 1993, Kodrík a kol., 2003). AKH jako peptidické hormony nejsou schopné volně pronikat přes buněčné membrány, a proto ovlivňují cílové buňky prostřednictvím specifických membránových receptorů. Tyto receptory patří k G-proteinové skupině a byly popsány u několika druhů hmyzu: *Drosophila melanogaster*, *Bombyx mori* (Park a kol., 2002; Staubli 2002), *Periplaneta americana* (Wicher a kol., 2006) a *Anopheles gambiae* (Kaufmann a Brown, 2006).

Hlavní funkcí AKH je mobilizace lipidů, cukrů a aminokyselin prolinu, což je na

buněčné úrovni zajištěno aktivací adenylátcyklázy, lipázy (Spencer a Candy, 1976), fosfolipázy C (Vroenen a kol., 1997), glykogen fosforylázy (Van Marrewijk a kol., 1980) a dalších enzymů spojených s metabolismem. AKH však mají pleiotropní účinky, tj. plní více biologických funkcí: inhibují syntézu RNA (Kodrík a Goldsworthy, 1995), lipidů (Gokuldas a kol., 1998) a proteinů (Carlisle a Loughton, 1979) a dále stimulují imunitní odpověď (Goldsworthy a kol., 2002), pohybovou aktivitu (Socha a kol., 1999), činnost srdce (Scarborough a kol., 1984) a inhibují uzrávání vajíček (Lorenz, 2003). Řídí také stimulaci antioxidantních mechanismů při vystavení organismu oxidačnímu stresu (Kodrík a kol., 2007; Večeřa a kol., 2007). Zajímavá je funkce AKH ve stresových situacích, které s bezprostřední nutností mobilizace energetických zdrojů přímo nesouvisí, přesto však zapříčiní uvolnění AKH do hemolymfy (Kodrík, 2008). Jsou to např. infekce (Goldsworthy a kol., 2005), světelný šok (Kodrík a Socha, 2005) a především ošetření insekticidy, které bylo studováno na modelech saranče pustinné *Schistocerca gregaria* (Candy, 2002) a ploštici ruměnici pospolné *P. apterus* (Kodrík a Socha, 2005; Kodrík a kol., 2009). Nejlépe prozkoumanou funkcí AKH je však jeho úloha při mobilizaci lipidů u modelového druhu saranče stěhovavé *L. migratoria*. U tohoto druhu je tento proces zvláště důležitý při migračních letech. Let slouží jako primární stimulus pro uvolnění AKH z CC do hemolymfy. AKH putuje hemolymfou k buňkám tukového tělesa, kde se napojí na specifický receptor a aktivací adenylátcyklázy dochází k produkci cAMP, který v přítomnosti Ca^{2+} spouští proteinkinázovou kaskádu. Ta aktivuje lipázu ke štěpení triacylglycerolu na diacylglycerol (DG) – hmyzí transportní formu tuků. DG je pomocí lipophorinů transportován do svalů, kde slouží jako hlavní zdroj energie (Goldsworthy a Mordue 1989; Van der Horst a kol., 1999).

L. migratoria je široce rozšířený druh hmyzu, který se vyskytuje v Africe, Asii, Austrálii, Novém Zélandě a někdy i v Evropě. U *L. migratoria* je znám fázový dimorizmus: podle hustoty populace se mění její chování a fyziologie. Může se tedy vyskytovat ve dvou formách - soliterní a gregarijní. Soliterní forma je usedlá, gregarijní se v hejnech vydává na migrační cesty, kde způsobuje nepředstavitelné škody i v oblastech velmi vzdálených od původního výskytu. Formy se od sebe liší barvou, chováním, reprodukcí, fyziologií a ekologií. Dalekých migračních letů je schopna pouze gregarijní forma. Za jeden den je takové hejno schopno uletět 5 – 130 km a v letu dosahuje rychlosti 15 – 20 km/hod. Velikost hejna může dosahovat až 100 km², kdy na 1 km² může být 40 – 80 mil. sarančí. Jeden jedinec je schopen zkonzumovat až 2 g čerstvé potravy denně. Na milion sarančat tedy připadne asi 1 tuna potravy. Za vhodných podmínek se populace může rychle rozmnožovat, a pokud nejsou

hejna kontrolována, mohou zničit v daných oblastech celou úrodu. Tyto skutečnosti se staly hlavním důvodem, proč byla *L. migratoria* použita jako hlavní modelový druh pro výzkum adipokinetických hormonů. Navíc se ukázalo, že právě *L. migratoria* je vhodným modelovým druhem hmyzu pro tento výzkum, protože byly popsány tři různé AKH. Locmi-AKH-I je decapeptid o sekvenci pGlu-Leu-Asn-Phe-Thr-Pro-Asn-Trp-Gly-Thr-NH₂ (Stone a kol., 1976) a Locmi-AKH-II a III jsou oktapeptidy. Locmi-AKH-II má sekvenci aminokyselin pGlu-Leu-Asn-Phe-Ser-Ala-Gly-Trp-NH₂ (Siegert a kol., 1985) a Locmi-AKH-III pGlu-Leu-Asn-Phe-Thr-Pro-Trp-Trp-NH₂ (Oudejans a kol., 1991). U *L. migratoria* má každý AKH svoji specifickou mRNA, která je translatovaná do prekursoru pre-pro-AKH o složení: signální peptid + příslušná AKH sekvence + sekvence pro peptid s neznámou funkcí (O'Shea a Rayne 1992).

Výše zmíněná interakce mezi AKH a insekticidy je zajímavým fenoménem, který by mohl být v budoucnu perspektivní pro kontrolu škodlivých populací hmyzu. Insekticidy jsou přípravky určené k hubení hmyzu v jeho různých vývojových stupních. Používají se v zemědělství, k ochraně zásob a také v oblasti hygieny. Existuje mnoho druhů insekticidů s různým mechanismem působení. Nejznámější jsou chemické insekticidy, mezi které patří např. organofosfáty (např. malation), pyrethroidy (např. permethrin), karbamáty (např. karbofuran) nebo chlorované uhlovodíky (např. DDT, mirex, dieldrin). Používají se také insekticidy na bázi bakterií a virů. Používání insekticidů a jiných cizorodých látek se projevuje v konečné fázi zvýšenou zátěží organismů a narušením jejich fyziologických procesů. Jejich rezidua zůstávají v půdě a začleňují se do potravních řetězců a hromadí se v mnoha organismech. Působení insekticidů ohrožuje také lidské zdraví. Zvyšuje se riziko vzniku rakoviny a poruchy reprodukce. Použití insekticidů vede i k likvidaci některých skupin opylovačů, a také ke sterilitě jedinců a rozpadu populací na nich závislých rostlinných taxonů. Jejich dlouhodobé užívání vedlo v mnoha případech ke vzniku hmyzí rezistence.

Řešením této dlouhodobě neudržitelné situace je hledání nových způsobů hubení hmyzích škůdců. Velmi zajímavé jsou první výsledky pokusů současné aplikace AKH s insekticidy. Zdá se, že hmyz je díky přítomnosti AKH k insekticidům citlivější, pravděpodobně z důvodů celkového navýšení hmyzího metabolismu (Kodrík a kol., 2009). To by ve svých důsledcích mohlo vést ke snižování insekticidních dávek používaných v praxi. Tomu může přispět i fakt, že AKH může za určitých okolností pronikat hmyzí kutikulou (Kodrík a kol., 2002 a, b; Lorenz a kol., 2004). Právě z těchto důvodů je tato problematika tématem mé bakalářské práce.

CÍLE PRÁCE

Cílem této práce bylo prostudovat vliv stresu vyvolaného insekticidem Ambush 25 EC - permethrin, na hladinu adipokinetických hormonů v CNS a v hemolymfě u saranče stěhovavé *Locusta migratoria*.

Konkrétní cíle zahrnovaly:

- Stanovení celkové hladiny AKH u saranče stěhovavé *L. migratoria*
- Posouzení vzájemných vztahů mezi jednotlivými AKH
- Určení zda jsou jednotlivé AKH ve stresové reakci upřednostňovány

MATERIÁL, METODY STUDIA

POKUSNÁ ZVÍŘATA

Populace pokusných zvířat *Locusta migratoria* byla chována v insektáriu Entomologického ústavu Biologického centra AVČR v Českých Budějovicích. Pokusná zvířata byla udržována při konstantní teplotě 30° C a při 12 hodinové fotoperiodě (12L : 12D). Krmena byla především trávou, v zimních měsících pak vypěstovanou pšenicí. Dále pak strouhaným zelím, mrkví a v neposlední řadě ovesnými vločkami a senem. Čerstvá potrava byla měněna každé 2 dny. Pokusy byly prováděny na dospělých jedincích starých asi 10 - 15dní.

APLIKACE INSEKTICIDU

K pokusům byl užíván insekticid – permethrin ze skupiny pyretroidů s obchodním názvem Ambush 25EC (Syngenta, UK). Tento přípravek obsahuje 25% aktivní látky. Vhodná dávka byla určena podle dose-response křivky (ústní sdělení školitele) na 100 µg (tedy 25 µg účinné látky) na 1 g živé hmotnosti zvířete. Tato dávka byla injikována v roztoku o koncentraci 20 µg insekticidu/µl rozpouštědla (5 µl/1 g živé hmotnosti). Jako rozpouštědlo byl použit Ringerův fyziologický roztok pro hmyz (0,13 M NaCl, 1,3 mM KCl, 6,8 mM CaCl₂ · 2H₂O, 2 mM MgCl₂ · 6 H₂O, 2 mM NaHCO₃). Insekticid byl aplikován pomocí mikroinjekční Hamiltonovy stříkačky (10 µl Hamilton Co., Reno, Nevada) opatrně do zadečku těsně pod tělní stěnu tak, aby nedošlo k poškození vnitřních orgánů. Kontrolním sarančatům byl najikován pouze samotný Ringerův roztok v dávce 5 µl/g. Zvířata byla ponechána v insektáriu ve svých standartních podmínkách po dobu 24 hod. Poté byla odebrána jejich hemolymfa a vypitvány endokrinní žlázy corpora cardiaca (viz níže).

ODBĚR HEMOLYMFY

Hemolymfa byla odebírána z oblasti kyčle třetího hrudního článku, kde byla jehlou propíchnuta jemná kutikula. Vytékající hemolymfa byla odebírána pipetou do ependorfky. Takto odebraná hemolymfa byla centrifugována (2 min, 10 000 rpm), aby se odstranily krevní buňky a případné kousky jiných tkání a pipetou byl odměřen odebraný objem. Hemolymfa byla uchovávána při teplotě -20°C pro další zpracování.

PITVA CORPORA CARDIACA

Pitva endokrinní žlázy CC byla provedena pod binokulární lupou pomocí pinzety a fyziologického Ringerova roztoku. Hlava *L. migratoria* byla nůžkami odstříhnutá a žiletkou rozpůlena její spodní část. Vrchní část hlavy byla nastřížena a poté entomologickými špendlíky připevněna na pitevní voskovou misku. Zalita byla kapkou fyziologického Ringerova roztoku. CC se nacházejí v blízkosti mozku a často nasedají na aortu. Po odklopení střeva byla CC dobře viditelná a tak mohla být snadno vyjmuta pinzetou a přemístěna do ependorfky.

EXTRAKCE ADIPOKINETICKÝCH HORMONŮ A JEJICH PRE – PURIFIKACE NA KOLONCE C18

Adipokinetické hormony byly extrahovány z CC u každého jedince zvláště v 80% metanolu. Každý pár orgánu byl sonikován ve 200 µl roztoku za chlazení ledem a centrifugován (2 min, 10 000 rpm). Vzniklý supernatant byl odebrán do další ependorfky. Sediment prošel celou extrakční procedurou ještě jednou a oba supernatanty z CC od jednoho jedince byly spojeny. Odebraný extrakt byl odpařen ve vakuové centrifuze (Speed Vac).

Extrakce AKH z hemolymfy o objemu 60 - 200 µl byla provedena podobným způsobem. Ekvivalent hemolymfy o objemu 100 µl byl smíchán s 300 µl 80% metanolu, sonikován na ledě a centrifugován 2 min při 10 000 rpm. Supernatant byl odebrán a k sedimentu bylo přidáno dalších 300 µl 80% metanolu. Celá procedura byla dvakrát zopakována. Spojené extrakty byly odpařeny ve vakuové centrifuze.

Takto připravený extrakt z hemolymfy byl předčištěn na kolonce Sep Pak C-18 (Waters):

Roztoky: A: 0,11% TFA (kyselina trifluoroctová) ve vodě

B: 60% CH₃CN (acetonitril) v 0,11% TFA ve vodě

1. Nejprve byla kolona aktivována promytím 7-10 ml roztoku B
2. Poté byla ekvilibrována 7-10 ml roztoku A. Po tomto kroku byla kolona připravena na nanesení vlastního vzorku.
3. Extrakt hemolymfy byl rozpuštěn v 5ml roztoku A, sonikován, stočen (2 min 10 000 rpm) a následně nanesen na kolonu. Vzorek byl přes kolonu promýván dvakrát, aby došlo k co nejúčinnějšímu navázání extrahovaného materiálu.
4. Před elucí vzorku byla kolona promyta 7-10 ml roztoku A a 4 ml 10% roztoku B (3,6 μ l roztoku A, 0,4 μ l roztoku B).
5. Vlastní vzorek byl eluován 3 ml roztoku B a následně 1 ml 100% CH₃CN. Sebraný vzorek byl odpařen ve vakuové centrifuze.

STANOVENÍ HLADINY AKH V CC (RP HPLC)

Hladina adipokinetických hormonů v CC byla stanovována pomocí metody HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Extrakt CC (viz níže) byl rozpuštěn ve 100 μ l aplikačního pufru (viz další kapitola) a 90 μ l bylo odebráno na HPLC analýzu (zbylých 10 μ l bylo použito na stanovení hladiny Locmi-AKH-I pomocí ELISA testu (viz další kapitola)). HPLC vzorek byl smíchán s acetonitrem tak aby jeho obsah odpovídal podmínkám na chromatografické koloně. Vlastní analýza probíhala na HPLC zařízení firmy Waters. Data byla sbírána pomocí programu CLARITY (DataApex, Praha). K vlastnímu dělení byla použita kolona reverzní fáze Chromolith Perfonamce RP-18e (Merk), s následujícím gradientem: 0 – 2 min 35% B, 2 – 20 min 35 – 80% B, A=0,11% TFA ve vodě, B=60% CH₃CN v 0,1% TFA, průtoková rychlost 1 ml/min. Jako detekční systém byl používán fluorimetr při vlnových délkách $\lambda_{ex} = 280$ nm, $\lambda_{em} = 348$ nm. Retenční časy hormonů Locmi-AKH-I, -II a -III byly určeny pomocí standartních roztoků syntetických hormonů. Frakce odpovídající těmto časům byly dále kvantifikovány pomocí standartních křivek odpovídajících syntetickým hormonům.

STANOVENÍ AKH-I V CC POMOCÍ METODY ELISA

Množství Locmi-AKH-I v CC bylo stanovováno také pomocí ELISA testu za pomoci specifické polyklonální protilátky Rabbit-I–Anti–(Tyr)–Locmi–AKH-I (Peninsula Laboratories).

Použité roztoky:

1. Aplikační pufr: bikarbonátový pufr (Na_2CO_3 , NaHCO_3). pH = 9,6.
2. Promývací pufr: 10 mM PBS pufr ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$). pH = 7,5. Po naředění 1:9 se přidá Tween 20, tak aby jeho koncentrace pufru byla 0,1%.
3. Blokovací pufr: 5% sušené mléko (skim milk) v promývacím pufru.
4. OPD (orthophenylendiamin) substrát byl připraven smícháním pufrů A - 0,1 M kyselina citrónová a B – 0,2 M Na_2HPO_4 , a OPD v následujícím poměru:
12,15 ml A + 12,85 ml B + 4,25 mg OPD (pH 5.0) + 1,25 μl 30% H_2O_2
5. 0,5 M H_2SO_4 : 2,72 ml koncentrovaná H_2SO_4 na 100 ml

Postup:

1. Do jamek mikrodestičky (Costar) byla aplikována 1/10 extraktu CC v aplikačním pufru v objemu 100 μl (10 μl extrakt + 90 μl aplikační pufr). Zároveň byl do dalších jamek aplikován syntetický Locmi-AKH-I o objemu 100 μl na jamku, který byl postupně ředěn dvojkovou řadou do dalších 16 jamek. Dávka aplikovaného syntetického Locmi-AKH-I byla 140pmol/ μl . Jako slepý vzorek (blank) byla použita řada jamek (zpravidla 8) do kterých bylo aplikováno 100 μl aplikačního pufru. Destička byla přes noc inkubována ve 4° C.
2. Jamky byly promyty třikrát 200 μl v promývacím pufru.
3. V objemu 200 μl na jamku byl aplikován blokovací pufr. Po dobu 120 min byl inkubován v 37° C.
4. Jamky byly promyty třikrát 200 μl v promývacím pufru.
5. Po promytí byla aplikována primární protilátka Anti-Locmi-AKH-I 100 μl na jamku, která byla naředěna v poměru 1 : 10 000 v promývacím pufru. Destička byla inkubována po dobu 60 min. při 37° C.
6. Jamky byly promyty třikrát 200 μl v promývacím pufru.
7. Byla aplikována sekundární protilátka (100 μl /na jamku, Goat anti rabbit–Sigma A 8275) naředěná 1 : 10 000 v promývacím pufru. Destička byla inkubována po dobu 60 min v 37° C.
8. Jamky byly promyty šestkrát 200 μl v promývacím pufru.
9. Bylo aplikováno 100 μl OPD substrátu na jamku. Destička byla zabalena do alobalu (reakce probíhala v temnu) a po dobu 40 min byla ponechána v inkubátoru při 37° C.
10. Přidáním 50 μl 0,5 M kyseliny sírové na jamku byla reakce zastavena.

11. Optická denzita byla měřena na ELISA čtečce (Molecular Devices) při vlnové délce 492 nm.

STANOVENÍ AKH-I V HEMOLYMFĚ ELISA TESTEM

Hladina Locmi-AKH-I v hemolymfě byla stanovována ELISA testem až poté, co byla hemolymfa předčištěna na kolonce Sep Pak a rozdělena na HPLC. Na stanovení byla brána pouze příslušná HPLC frakce. Stanovení hladiny AKH-I ELISA testem bylo podobné jako u CC (viz předchozí kapitola). Postup se lišil v několika bodech:

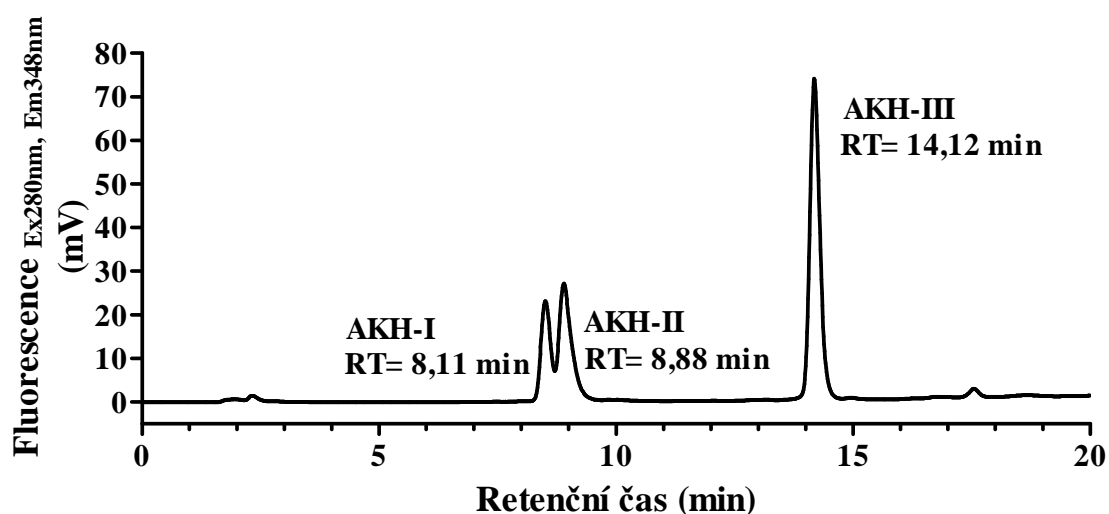
- Extrakt hemolymfy (60-200 μ l ekvivalent) byl aplikován v aplikačním pufru o objemu 100 μ l na jamku.
- Primární protilátka byla naředěna 1 : 5000 a nanášena na jamky v objemu 100 μ l.
- Sekundární protilátka byla pro hemolymfu naředěna v poměru 1 : 5000, na jamky nanášeno 100 μ l.

STATISTICKÉ VYPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ:

Pro statistické vypracování výsledků byl použit studentův t-test na 5% hladině průkaznosti. Pro konstrukci grafů byl použit software Prism (GraphPad Software, version 4, CA USA).

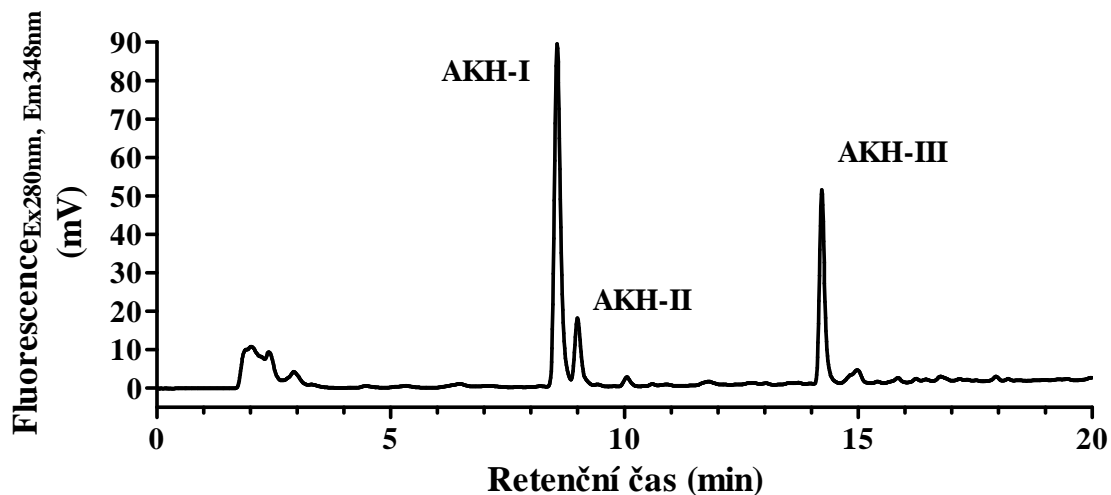
VÝSLEDKY

Pro zjištění hladiny adipokinetických hormonů v CC u *L. migratoria* a jejich změn po aplikaci insekticidu permethrinu byla použita metoda RP HPLC. Před vlastním dělením vzorku byly na kolonu aplikovány standarty jednotlivých hormonů Locmi-AKH-I, -II a -III v dávce asi 200 pmol/hormon. Dělení této směsi ukázalo výskyt 3 peaků (Obr. 1), které odpovídaly jednotlivým hormonům s následujícími retenčními časy (RT): Locmi-AKH-I RT=8,11 min, Locmi-AKH-II RT=8,88 min a Locmi-AKH-III RT=14,12 min. Tím byly určeny oblasti, ve kterých bylo možné očekávat výskyt vlastních AKH v analyzovaném materiálu.

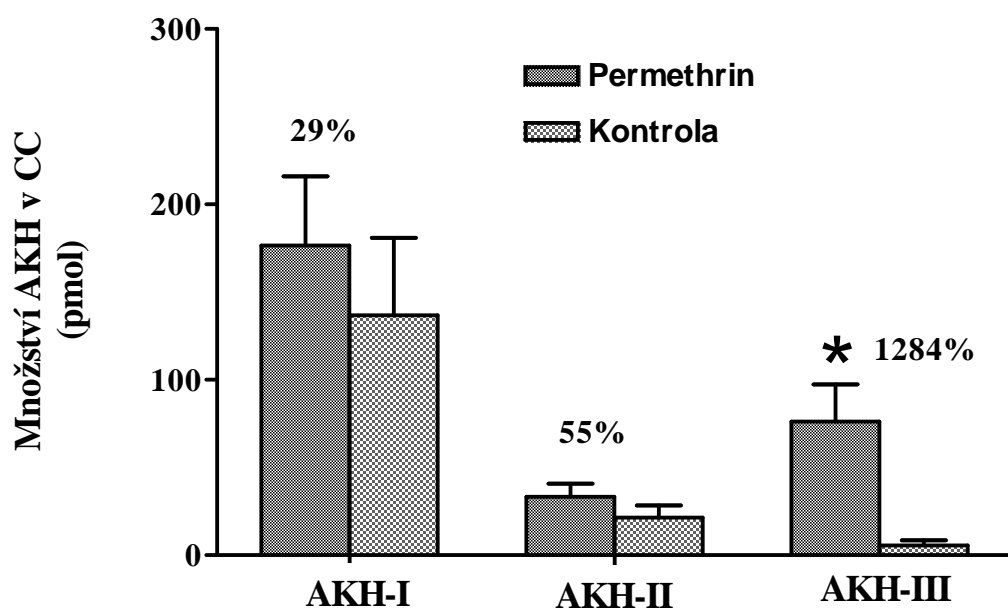


Obr. 1 HPLC standardů Locmi-AKH-I, -II a -III v dávce 200 pmol/AKH na koloně Chromolith Performance RP-18e (Merk).

Metanolvý extrakt z CC každého pokusného jedince byl rozdělen na RP HPLC za stejných podmínek jako tomu bylo u standardů. Eluční profil ukázal jasné zastoupení všech tří AKH *L. migratoria* (Obr. 2) – jejich RT odpovídaly RT standardů. Za použití softwaru Clarity byly vypočítány plochy těchto peaků a pomocí kalibračních křivek pro jednotlivé syntetické hormony (dodaných školitelem) byly tyto plochy přepočítány na pmol AKH/CC.



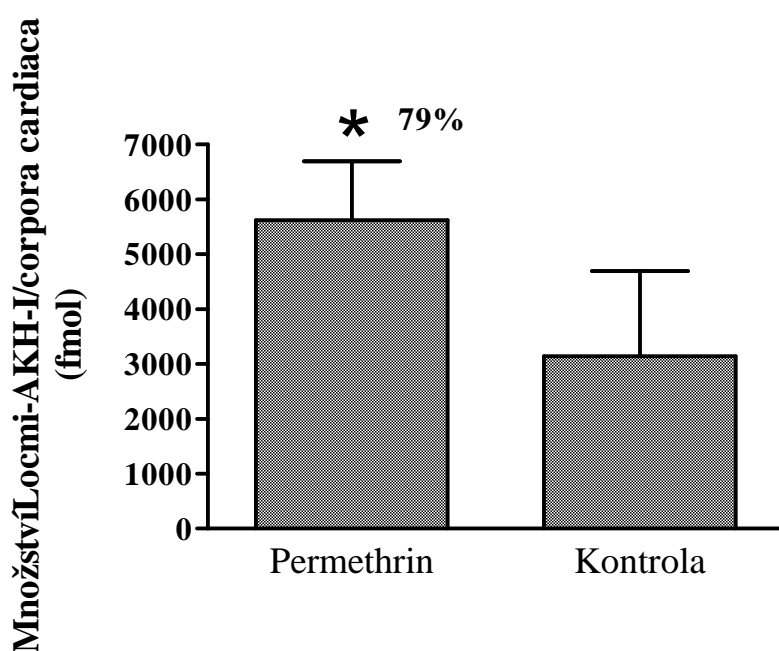
Obr. 2 Eluční profil metanolového extraktu jednoho páru CC po ošetření permethrinem na RP HPLC. Jednotlivé hormony byly identifikovány srovnáním RT se standardy (viz obr. 1)



Obr. 3 Stanovení hladiny adipokinetických hormonů Locmi-AKH-I, -II a -III v CC 24 hod. po aplikaci permethrinu (25 $\mu\text{g/g}$) pomocí HPLC. Kontrolní jedinci byli ošetřeni pouze Ringerovým fyziologickým roztokem. Množství jednotlivých AKH bylo vypočteno pomocí standardních křivek (podrobnosti viz text). Uvedená % ukazují, o kolik byla navýšena hladina jednotlivých hormonů po aplikaci permethrinu. * - naznačuje statisticky významný rozdíl na 5% hladině průkaznosti.

Výsledky ukázaly, že po aplikaci permethrinu jako stresového faktoru došlo k navýšení obsahu všech tří AKH v CC (Obr. 3), avšak pouze u Locmi-AKH-III bylo navýšení průkazné. Hladina Locmi-AKH-I se navýšila o 29%, Locmi-AKH-II o 55% a Locmi-AKH-III o 1284%.

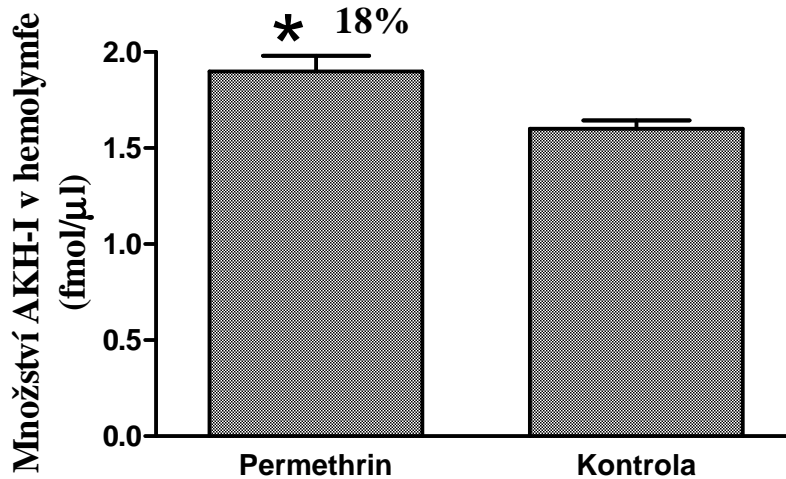
Údaje o hladinách Locmi-AKH-I stanovených v CC pomocí HPLC byly ověřeny ELISA testem v surovém extraktu CC, protože byla k dispozici protilátka pouze proti Locmi-AKH-I. Výsledky ukázaly, že hladina tohoto hormonu, se po aplikaci permethrinu zvýšila o 79% (Obr. 4). V tomto případě bylo navýšení signifikantní: lze to snad vysvětlit vícenásobným opakováním pokusu a také tím, že tato imunologická metoda je mnohem citlivější než výpočet hladin hormonů výše zmíněnou metodou pomocí HPLC.



Obr. 4 Stanovení hladiny Locmi-AKH-I v CC 24 hod. po aplikaci permethrinu (25 $\mu\text{g/g}$) pomocí ELISA testu. Kontrolní jedinci byli ošetřeni pouze Ringerovým fyziologickým roztokem. Uvedené % ukazuje, o kolik byla navýšena hladina jednotlivých hormonů po aplikaci permethrinu. * - naznačuje statisticky významný rozdíl na 5% hladině průkaznosti

Při stresové reakci vyvolané insekticidem se AKH syntetizované v CC uvolňují do hemolymfy, proto byla v další fázi experimentu sledována jejich hladina v hemolymfě. Ukázalo se však, že použitými metodami lze měřit pouze hladinu Locmi-AKH-I prostřednictvím ELISA testu; druhé dva AKH nebylo možné pomocí HPLC přístupem sledovat

kvůli jejich nízké hladině, na kterou použitý test nebyl dostatečně citlivý. ELISA test prokázal navýšení Locmi-AKH-I v hemolymfě po aplikaci permethrinu pouze o 18% (Obr. 5). Toto navýšení ale bylo signifikantní.



Obr. 5 Stanovení hladiny Locmi-AKH-I v hemolymfě (chromatograficky předčištěné – viz Materiál a metodika) 24 hod. po aplikaci permethrinu (25 $\mu\text{g/g}$) pomocí ELISA testu. Kontrolní jedinci byli ošetřeni pouze Ringerovým fyziologickým roztokem. Uvedené % ukazuje, o kolik byla navýšena hladina jednotlivých hormonů po aplikaci permethrinu. * - naznačuje statisticky významný rozdíl na 5% hladině průkaznosti.

DISKUSE

O vzájemných interakcích hmyzích neurosekretorických buněk produkujících AKH s insekticidy bylo publikováno jen několik málo prací. Je zajímavé, že první z nich se objevila již v roce 1982, kdy Singh a Orchard zjistili, že aplikace insekticidu u *L. migratoria* moduluje aktivitu buněk CC a vede k výraznější produkci AKH. Tento výsledek se nezdá být překvapující, protože insekticidní ošetření hmyzího organismu představuje navození výrazného stresu, tedy situace, kdy obecně uvolňování AKH z CC do hemolymfy narůstá (Kodrík, 2008). Podobně tomu bylo i v mých experimentech, kdy ošetření *L. migratoria* permethrinem, vyvolalo po 24 hod. nárůst hladiny všech tří AKH v CC. Je zajímavé, že hladiny jednotlivých AKH se nezvyšovaly stejným způsobem: hladina Locmi-AKH-I a Locmi-AKH-II se zvýšila pouze o 29% resp. 55%. Obrovské zvýšení o 1284% bylo zaznamenáno u Locmi-AKH-III. To naznačuje, že jednotlivé AKH by mohly být specializovány ve své funkci. Toto je velmi důležité a závažné tvrzení, které je třeba ověřit další sérií experimentů, což však přesahuje rámec mé bakalářské práce.

Vliv insekticidu permethrinu na produkci AKH byl studován také na ploštici ruměnici pospolné *P. apterus*, která se velmi dobře hodí k podobným experimentům z řady důvodů: pro srovnání s *L. migratoria* je důležité, že tento druh má dva AKH: Pyrap-AKH (Kodrík a kol., 2000) a Peram-CAH-II (Kodrík a kol., 2002). Z několika sérií experimentů vyplynulo, že po 20 min. po aplikaci permethrinu nedošlo k žádným změnám hladin AKH v CNS (Kodrík a Socha, 2005), pokud se však nechal permethrin působit 24 hod. hladina AKH se v CNS průkazně navýšila (Kodrík a kol., 2009). Je zajímavé, že podobně jako v mých experimentech s *L. migratoria* i u *P. apterus* docházelo k rozdílnému zvýšení obou hormonů: po aplikaci insekticidu se změnily vzájemné poměry mezi AKH (Kodrík a Socha, 2005), což naznačuje jistou specializaci jednotlivých AKH.

Ve své práci jsem také sledovala, jak ošetření permethrinem ovlivní hladinu AKH v hemolymfě. Z metodických důvodů bylo možné sledovat pouze změny u Locmi-AKH-I. Je to z toho důvodu, že hladina adipokinetických hormonů v hemolymfě je obecně u hmyzu asi 100 až 1000x nižší než v CNS (Goldsworhy a kol., 2003). Proto je měření AKH v hemolymfě velmi obtížné, předchází mu složitá chromatografická příprava vzorku a v našich podmínkách bylo možné pouze pomocí testu ELISA a vhodné protilátky. Protože byla k dispozici jenom protilátka proti Locmi-AKH-I stanovovala jsem v hemolymfě pouze hladinu tohoto hormonu. Zjištěné navýšení – o 18% - se nejeví jako příliš výrazné, ale díky malému rozptylu a většímu počtu opakování pokusu bylo signifikantní. Tento výsledek je v souladu s literárními údaji

zjištěnými u jiných druhů hmyzu. Candy (2002) zjistil podobný efekt u *Schistocerca gregaria*, kde aplikace insekticidu deltamethrinu zvyšovala hladinu Schgr-AKH-I a -II až o dva řády. Podobný efekt měly kromě deltamethrinu také další stresové faktory např. aplikace větší dávky roztoku KCl. Insekticidní navýšení hladiny AKH v hemolymfě bylo zjištěno i u *P. apterus*, a to nejen po 24 hod. (Kodrík a kol., 2009), ale dokonce i po 20 min. (Kodrík a kol., 2005), které bylo rovněž signifikantní. Zvýšení hladiny AKH bylo zaznamenáno také u mandelinky bramborové *Leptinotarsa decemlineata*, která byla krmena geneticky modifikovanými bramborami obsahujícími toxický lektin ze sněženky podsněžník *Galanthus nivalis* (GNA) nebo *Bacillus thuringiensis* toxin (Cry 3Aa) (Kodrík a kol., 2007). Tyto toxiny zvyšovaly hladinu AKH jak v CC, tak v hemolymfě. Navíc bylo zjištěno, že jak GNA tak Cry 3Aa vyvolávají v organismu stav oxidačního stresu (Hassan, 1984) a že mezi oxidačním stresem a AKH existuje vzájemný vztah. Zdá se totiž, že AKH se podílí na aktivaci anti-oxidačních stresových reakcí (Kodrík a kol., 2007; Večeřa a kol., 2007).

Závěrem lze tedy konstatovat, že aplikace permethrinu do pokusných jedinců *L. migratoria* vyvolala stresovou reakci, která vedla ke zvýšení AKH v CC i hemolymfě, a že tento fakt doplňuje již dříve známé literární údaje.

ZÁVĚR

U *L. migratoria* byl sledován vliv stresu vyvolaného insekticidem Ambush 25 EC-permethrin na hladinu adipokinetických hormonů v CC a hemolymfě. Byly zjištěny následující skutečnosti.

- Injikace insekticidu permethrinu dospělých jedinců *L. migratoria* způsobuje po 24 hod. ošetření zvýšení hladiny adipokinetických hormonů v jejich těle.
- V endokrinní žláze corpora cardiaca dochází po ošetření insekticidem ke zvýšení hladiny všech tří AKH. Nejvyšší navýšení bylo pozorováno u Locmi-AKH-III.
- U pokusných jedinců dochází ke zvýšení hladiny Locmi-AKH-I také v hemolymfě. Hladiny hormonů Locmi-AKH-II a Locmi-AKH-III nebyly v hemolymfě měřeny.

SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

Bray M. M., Shafi S., Wheeler C. H. & Goldsworthy G. J. 1993: Quantification by radionimmunoassay of the adipokinetic hormone – in neural tissues in the head of *Locusta migratoria*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 106A: 25 –262.

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

Carlisle J. & Loughton B. G. 1979: Adipokinetic hormone inhibits protein synthesis in locusta. *Nature*, 282: 42 –421.

Gäde G., Goldworthy G. J. 2003: Insect peptide hormones: a selective review of their physiology and potential application for pest kontrol. *Pest Management Science*, 59: 1063-1075.

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

Gokuldas M., Hunt P. A. & Candy D. J. 1998: The inhibition of lipid synthesis in vitro in the locust, *Schistocerca gregaria*, by factors from corpora cardiaca. *Physiological Entomology*, 13: 43–48.

Goldsworthy G. J., Opoku – Ware K. & Mullen L. M. 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: 60 –608.

Goldsworthy G. J. & Mordue W. 1989: Adipokinetic hormones: Function and structures. *Biological Bulletin*, 177: 218-224.

Goldsworthy G. J., 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: 795–803.

- Goldsworthy G. J., Opoku – Ware K. & Mullen L. M. 2005:** Adipokinetic hormone and the immune response of locusts to infection. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1040: 106–113.
- Hassan, H.M. 1984:** Exacerbation of superoxide radical formation by paraquat. *Academic Press, Orlando, Florida*, 105: 523–532.
- Hoffmann K. H. & Lorenz M. W. 1998:** Recent advances in hormones in insect pest control. *Phytoparasitica*, 26: 323–330.
- Kaufmann C. & Brown M. R. 2006:** Adipokinetic hormone 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: 466–481.
- Kodrík D. 2008:** Adipokinetic hormone functions that are not associated with insect flight. *Physiological Entomology*, 33: 171–180.
- Kodrík D. & 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*, 4: 127–133.
- Kodrík D., Bártů I. & Socha R. 2009:** Adipokinetic hormone amplifies the efficiency of insecticide. *Pest Management Science* (submitted).
- Kodrík D., Krishnan N. & Habušťová O. 2007:** Is the titer of adipokinetic peptides in *Leptinotarsa decemlineata* fed on genetically modified potatoes increase by oxidative stress? *Peptides*, 28: 974–980.
- 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*. *Journal of Insect Physiology*, 49: 53–61.
- Kodrík D., Socha R. & Syrová Z. 2005:** The effect of constant darkness on the content of adipokinetic hormone, adipokinetic response and walking activity in macropterous females of *Pyrrhocoris apterus* (L.). *Physiological Entomology*, 30: 248–255.
- Kodrík D., Socha R. & Zemek R. 2002a:** Topical application of Pya-AKH stimulates lipid mobilization and locomotion in the flightless bug, *Pyrrhocoris apterus* (L.) (Heteroptera). *Physiological Entomology*, 27: 15–20.

- Kodrík D., Šimek P., Lepša L. & Socha R. 2002b:** Identification of the cockroach neuropeptide Pea-CAH-II as a second adipokinetic hormone in the firebug *Pyrrhocoris apterus*. *Peptide*, 23: 583–585.
- Kodrík D., Socha R., Šimek P., Zemek R. & Goldsworthy G. 2000:** A new member of the AKH/RPCH family that stimulates locomotory activity in the firebug. *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30: 489–498.
- Köllisch G. V., Lorenz M. W., Kellner R., Verhaert P. D. and 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: 5502–5508.
- Lorenz M. W. 2003:** Adipokinetic hormone inhibits the formative of energy stores and egg production in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 136: 197–206.
- Lorenz M. W., Zemek R., Kodrík D. & Socha R. 2004.** Lipid mobilisation and locomotor stimulation in *Gryllus bimaculatus* (de Geer) (Ensifera, Gryllidae) by topically applied adipokinetic hormone. *Physiological Entomology*, 29: 146–151.
- O’Shea M. & Rayne R. C. 1992:** Adipokinetic hormones: cell and molecular biology. *Experientia*, 48: 430–38.
- Oudejans R. C. H. M., Kooiman F. P., Heerma W., Versluis C., Sotboom A. J. & Beenackers A. M. T. 1991:** Isolation and structure elucidation of a novel adipokinetic hormone (Lom-AKH-III) from glandular lobe of the corpus cardiacum of the migratory locust, *Locusta migratoria*. *European Journal Biochemistry*, 195: 351–359.
- 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 Science of the United States of America*, 99: 11423–11428.
- Rayne R. C. & O’Shea M. 1997:** Neuropeptide biosynthesis: Possible molecular targets for the control of insect pests. *Phytochemicals for Pest Control*, 658: 292–300.
- Roeder T. 1999:** Octopamine in invertebrates, *Progress in Neurobiology*, 59: 533–561.

Scarborough R. M., Jamieson G. C., Kalisz F., Kramer S. J., McEnroe G. A., Miller C. M. & Schoolex D. A. 1984: Isolation and primary structure of two peptides with cardio acceleratory and hyperglycaemic activity from the corpora cardiaca of *Periplaneta americana*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 81: 5575–5579.

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: 184-194.

Siegert K. J., Morgan P. J. & Mordue W. 1985: Primary structure to locust adipokinetic hormone II. *Biological Chemistry Hoppe – Seyler*, 366: 723–727.

Socha R., Kodrík D. & Zemek R. 1999: Adipokinetic hormone stimulates insect locomotor activity. *Naturwissenschaften*, 88: 85–86.

Spencer I. M. & Candy D. J. 1976: Hormonal control of diacylglycerol mobilization from fat body of the desert locust. *Schistocerca gregaria*. *Insect Biochemistry*, 6: 289–296.

Staubli F., Jorgensen T. J. D., Cazzamali G., Williamsom M., Lenz C., Sondergaard L., Roepstorff P. & Grimmlikhuijzem C. J. P. 2002: Molecular identification of the insect adipokinetic hormone receptors. *Proceedings of the National Academy of Sceince of the United States of America*, 99: 3446–3451.

Stone J. V., Mordue W., Blatney K. E. & Morfia H. R. 1976: Structure of locust adipokinetic hormone, a neurohormone that regulates lipid utilization during flight. *Nature*, 236: 207–211.

Van der Hors D. J., Van Marrewijk W. J. A., Vullings G. B. & Diederren H. B. 1999: Metabolic neurohormones: Release, signal transduction and physiological response of adipokinetic hormones in insects. *European Journal of Entomology*, 96: 2999–2308.

Van Merrewijk W. J. A., Van Den Boek A. T. M. & Beenackers A. M. T. 1980: Regulation of glycogenolysis in the locust fat body during flight. *Insect Biochemistry*, 10: 675–679.

Večeřa J., Krishnan M., Alquicer G., Kodrík D. & Socha R. 2007: Adipokinetic hormone – induced enhancement of antioxidant capacity of *Pyrrhocoris apterus* hemolymph in response to oxidative stress. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 146: 336–342.

Vroenen S. F., Van Marrewijk W. J. A., De Meijer J., Van den Broek A. T. M. & Van der Horst D. J. 1997: Differential induction of inositol phosphate metabolism by free adipokinetic hormones. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 130: 131–139.

Wicher D., Agricola H. J., Sohler S., Gundel M., Heinemann S. H., Wollweber L., Stengl M. & Derst C. 2006: Differential receptor activation by cockroach adipokinetic hormones produces differential effects on ion currents, neuronal activity, and locomotion. *Journal of Neurophysiology*, 95: 2314–2325.