

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Přírodovědecká fakulta



## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Analýza mastných kyselin v diglyceridech a triglyceridech z hemolymfy a tkání hmyzu pomocí plynové chromatografie**



Tomáš Urban

2010

Školitel: RNDr. Aleš Tomčala Ph.D.

Urban, T., 2010: **Analýza mastných kyselin v diglyceridech a triglyceridech z hemolymfy a tkání hmyzu pomocí plynové chromatografie.** [Analysis of Fatty Acids in Diacylglycerols and Triacylglycerols of Insects Haemolymph and Tissues by Gass Chromatography. Bc. Thetis, in Czech.] – 35. p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

## **Anotace**

Předkládaná práce zahrnuje zvládnutí metody GC/FID (kapalinová chromatografie s plamenovým ionizačním detektorem) a jí předcházející přípravy vzorku pomocí SPE (extrakce na tuhé fázi) a transesterifikace. Součástí práce je rešerše na téma energetický metabolismus hmyzu s důrazem na mobilizaci lipidů. Do rešerše byl zahrnut i soubor informací o pokusném hmyzu ruměnici pospolné - *Pyrrhocoris apterus*.

## **Anotation**

This study deals with analytical technique – Gas chromatography coupled with flame ionization detector. The aim of the thesis is to handle the GC/FID method including sample preparation techniques (raw biological materiál extraction, solid phase extraction followed by transesterification derivatization). This study also provides literature review of energetical metabolism of insect with emphasis on lipid metabolism and mobilization. These thesis also include information about popular insect model *Pyrrhocoris apterus*.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma „Analýza mastných kyselin v diglyceridech a triglyceridech z hemolymfy a tkání hmyzu pomocí plynové chromatografie“ vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě, elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne 30.4.2010

.....

## **Poděkování**

Zde bych chtěl poděkovat všem, kdo mi pomohli s uskutečněním mé práce. Děkuji za možnost provedení své bakalářské práce v Laboratoři analytické biochemie Entomologického ústavu Biologického centra v.v.i. v Českých Budějovicích zaměstnancům tohoto oddělení, jmenovitě Petru Šimkovi, Heleně Zahradníčkové, Janě Cimlové a v neposlední řadě školiteli Aleši Tomčalovi, za vedení, pomoc a neutuchající podporu při tvorbě této práce. Dále pak děkuji Ivě Bártů z oddělení fyziologie Entomologického ústavu za přípravu biologického materiálu a cenné rady týkající se fyziologie hmyzu.

Nechci opomenout poděkovat i své rodině, přítelkyni a kamarádům za vytvoření zázemí, při kterém jsem mohl tuto práci uskutečnit.

1.	Úvod do problematiky – mobilizace lipidů	1
2.	Cíle práce	2
3.	Teoretická část	
3.1	Biologická část	
3.1.1	Tukové těleso	3
3.1.2	Energetický metabolismus hmyzu – mobilizace energie	4
3.1.2.1	Zdroje energie pro let	5
3.1.2.2	Hormonální řízení mobilizace energie – AKH	8
3.1.3	Regulace metabolismu lipidů	8
3.1.4	Transport lipidů	10
3.1.5	Příjem energie v podobě lipidů	11
3.1.6	Výdej energie	13
3.1.7	<i>Pyrrhocoris apterus</i> , morfy, adipokinetické hormony a hemocyty	15
3.2	Chemická část	
3.2.1	Plynová chromatografie/ s plamenově ionizačním detektorem (Gas chromatography/Flame ionization detektor GC/ FID)	17
3.2.2	Extrakce na tuhou fázi (Solid phase extraction – SPE)	18
3.2.3	Transesterifikace	19
4.	Praktická část	
4.1	Metodika GC/FID	
4.1.1	Práce s definovanými standardy methyesterů mastných kyselin	21
4.1.2	Linearita odezvy FID ve fyziologických koncentracích analytu	22
4.2	Extrakce lipidů ze vzorku	22
4.3	Metoda SPE	23
4.4	Metodika Transesterifikace	25
5.	Diskuse	26
6.	Závěr	27
	Literatura	28
	Seznam použitých zkratk	31
	Přílohy	32

## 1. Úvod do problematiky – mobilizace lipidů

Energetický metabolismus hmyzu je předmětem zájmu již po mnohá desetiletí. Intenzivní výzkum na tomto poli nám přinesl nemalé množství poznatků a daleko více otázek. Dnešní moderní chemicko-analytické metody nám umožňují studovat metabolické jevy mnohem detailněji, než tomu bylo v minulosti. Na základě dosavadních informací o energetickém metabolismu hmyzu jej lze rozdělit podle využívání energetických zdrojů na tři skupiny. První nejrozšířenější zahrnuje hmyz, jehož primárním zdrojem energie je cukr a to konkrétně trehalóza (Beenakeers et al, 1984). Další skupina, zahrnující řády orthoptera, některá heteroptera a lepidoptera, používá jako zdroj energie lipidy, konkrétně triacylglyceroly (TAG). Poslední skupinou jsou některé diptera či coleoptera, které využívají jako energetického paliva aminokyselinu prolin (Beenakeers et al, 1984; (Arrese and Soulagés, 2010).

Ať už je zdroj energie jakýkoliv, je celý proces energetické mobilizace řízen hormonálně a to pomocí jednoduchých okta až dekaeptidů zvaných adipokinetické hormony (AKH). AKH jsou přítomny u všech zkoumaných druhů hmyzu a také korýšů (Gade et al., 2006). Adipokinetické hormony u hmyzu fungují podobně jako adrenalin u savců, proto jim říkáme stresové hormony. Již byly publikovány mnohé práce, které se zabývají mechanismem funkce adipokinetických hormonů u hmyzu, využívajícího jako hlavní zdroj energie lipidy, ale jen málo prací se zabývá detekcí konkrétních molekul souvisejících s energetickým, respektive lipidickým metabolismem. Obvykle používaná detekční metoda je na bázi sulfovanilinové eseje, která detekuje pouze četnost dvojných vazeb mastných kyselin, nikoliv však konkrétní molekuly, které tyto mastné kyseliny představují (Tomcala et al, 2010). Naším novým přístupem je použití instrumentálních analytických technik, jako je LC/MS (kapalinová chromatografie v kombinaci s hmotnostní detekcí) pro identifikaci celých molekul a dále pak populární metoda plynná chromatografie s plamenově ionizační detekcí (GC/FID).

## **2. Cíle práce**

Tato práce je primárně metodická a má za úkol zvládnout a aplikovat metodu GC/FID. Jedná se o sofistikovanou chemicko-analytickou metodu, která vyžaduje zvládnutí metody samotné, a také nutnou přípravu vzorků. V případě studia acylglycerolů jako jsou TAGs a DAGs (diacylglyceroly) je nutné nejdříve vzorky převést do podoby vhodné pro GC/FID, což zahrnuje jak samotnou extrakci, následné rozdělení na jednotlivé lipidické třídy, a konečnou transesterifikaci.

Primárním cílem detekce jsou TAG a DAG. Jejich hlavní, ale nikoliv jediná, funkce v organismu, je zásobní. Pro práci byl tedy vybrán fyziologický problém mobilizace lipidů, při kterém právě zmíněné tuky hrají nezastupitelnou úlohu. Dalším cílem práce je tedy vypracování krátké rešerše na toto téma.

### 3. Teoretická část

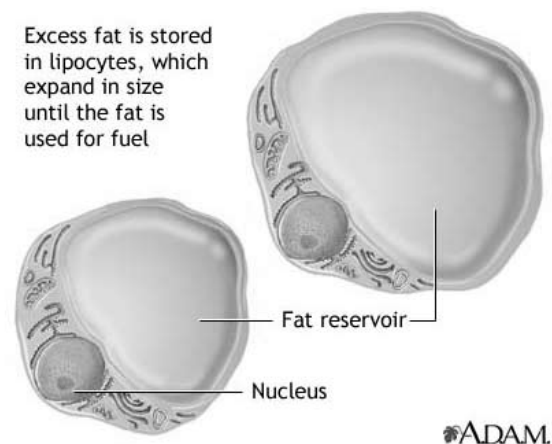
#### 3.1 Biologická část

##### 3.1.1 Tukové těleso

Tukové těleso hmyzu je dynamický orgán ovlivňující svou funkcí řadu metabolických pochodů v organismu. Hlavní funkcí ale zůstává ukládání a uvolňování energie z energeticky bohatých substrátů - zásob. Hmyz ukládá energii ve formě glykogenu a TAG v buňkách tukového tělesa. V tukovém tělese se také syntetizuje většina hemolymfálních proteinů (lipophorin, vitellogenin). Tukové těleso produkuje i několik antibakteriálních peptidů, lze jej tedy nazvat multifunkčním orgánem (Arrese and Soulages, 2010).

Akumulace zásob je velmi důležitá hlavně u holometabolního hmyzu, jelikož tvorba kukly a celková přeměna v dospělé jsou energeticky nesmírně náročné. Krmením v larválním stádiu se ukládá množství energetických substrátů, které později organismus využije pro metamorfózu a často i pro počáteční období dospělosti. Bez dostatku uložené energie je metamorfóza pro jedince smrtelná. Zásoby jsou důležité i pro plodnost a následný správný vývoj vajíček. Ten právě vyžaduje poměrně značnou mobilizaci energie ve formě přenosu energeticky bohatých substrátů z tukového tělesa do vaječníku (Arrese and Soulages, 2010).

Tukové těleso je poměrně velký orgán analogický savcím játrům, obklopující střevo a reprodukční orgány. Na rozdíl od jater jde o poměrně volnou tkáň bez pevné struktury. Tukové těleso je heterogenní orgán a vykazuje dokonce regionální morfologické diference. Tvoří velké laloky, které jsou omývány hemolymfou, díky čemuž je maximálně využit povrch tukového tělesa. Toto je především u hmyzu důležité jelikož při zvýšené námaze organismu zde může snadno docházet až k 50-100x větší spotřebě energie než v klidovém stavu. Základní buňkou tukového tělesa je adipocyt s lipidickými zásobami (Arrese and Soulages 2010).



Obr. 1.: Adipocyty

Adipocyty mohou uložit velké množství energie v lipidických rezervách formou cytoplazmatických lipidových kapének. Dále jsou v tukovém tělese obsaženy urocyty, které slouží k uskladňování močoviny. Byly popsány u švábů a sarančat, ale nikoli u skupiny Lepidoptera. Třetím druhem buněk tukového tělesa byl identifikován mycetocyt, nalezený u mšic a švábů. Obsahuje mikroorganismy žijící uvnitř vakuol a jsou s hostitelem v symbióze. Předpokládá se, že díky symbióse dokáže hostitel využít z potravy složky, které by sám nevyužil (Arrese and Soulages, 2010).

Lipidy tvoří asi 90% celkového obsahu tukového tělesa. Většinu lipidických komponent tvoří TAG a jsou využívány pro pokrytí energeticky náročného chování hmyzu jako je například let. Jiné metabolické potřeby jsou uspokojovány glykogenem. Ten se může během metamorfózy téměř vyčerpat. Jakmile se však začne jedinec krmit, začne se glykogen ukládat. Je syntetizován z UDP-glukózy, která slouží jak k syntéze glykogenu tak i trehalózy. Když je dosaženo určité koncentrace trehalózy v tukovém tělese, inhibuje se její syntéza a UDP-glukóza syntetizuje glykogen (Arrese and Soulages, 2010).

### **3.1.2 Energetický metabolismus hmyzu – mobilizace energie**

Jak už bylo v úvodu řečeno, hmyz obecně se dá z hlediska mobilizace energie rozdělit do tří základních skupin. Na ty co využívají k pokrytí svých energetických potřeb cukerných substrátů, TAG a prolin (Beenackers et al., 1984; Arrese and Soulages, 2010).

Hmyzí létací sval patří mezi metabolicky nejvíce aktivní tkáň. Protože se v létacím svalu nemůže ukládat energie v podobě vysoce energetických substrátů, musí být tato tkáň zásobena prostřednictvím hemolymfy pomocí energetických cirkulujících substrátů. Pro let jsou využívány lipidy a to hlavně kvůli jejich energetické výhodnosti, mají oproti glykogenu vyšší obsah kalorií (na hmotnostní jednotku) a uvolňuje při oxidaci 2x více vody (Beenackers et al., 1984).

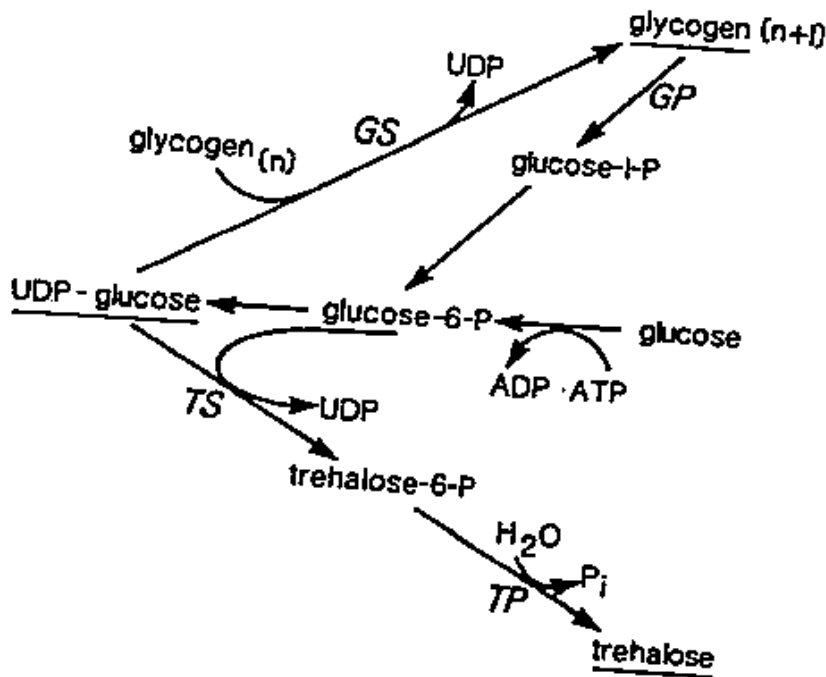
Zásoba energie v létacím svalu je obvykle limitována, proto se během letu musí mobilizovat a transportovat TAG rezervy akumulované v tukovém tělese. Většinový hemolymfální lipid však tvoří DAG (Beenackers et al., 1984). Nejdříve tedy musí dojít k rozštěpení TAG na DAG a jejich přenos do hemolymfy, kde jsou přenášeny pomocí low-density-lipoprotein (LDLp) a specifická lipoprotein-lipáza hydrolyzuje DAG od LDLp a výsledkem jsou masné kyseliny (FAs) a glycerol, které jsou přijímány létacím svalem (Arrese et al., 2001; Canavoso et al., 2001).



### 3.1.2.1 Zdroje energie pro let

Hemolymfální trehalóza je obnovována pomocí glykogenové zásobárny v tukovém tělese, V hemolymfě *Locusta migratoria* je trehalóza hlavním zdrojem energie během prvních 20 až 30 minut letu, přičemž její koncentrace postupně klesá až dosáhne poměrné rovnováhy. Vytěžená míra energie z hemolymfální trehalózy je během rovnováhy oproti první periodě letu mnohem nižší. Hlavním substrátem pro let se nyní stávají lipidy. Trehalóza stále poskytuje stále okolo 25 % energie z celkové energetické podpory pro let. Klidová fáze trehalózy je udržována pomocí mobilizace jiných uhlovodíkových zdrojů, hlavním z nich je glykogen z tukového tělesa (Beenackers et al., 1984).

Kromě udržování energetické bilance metabolismu je tedy trehalóza využívána i jako částečný substrát pro let. Hmyz, který létá na dlouhé vzdálenosti (sarančata, komáři, motýli), začíná užívat nejprve trehalózu a až po čase přejde na spotřebu lipidů. Hmyz létající na krátké vzdálenosti, jako třeba mandelinky (*Leptinotarsa decemlineata*), oxiduje jako energetický substrát pro let prolin, také potřebují současné využití glukózy k produkci pyruvátu a umožnění průběhu prolin-alaninového cyklu (Arrese and Soulages, 2010).



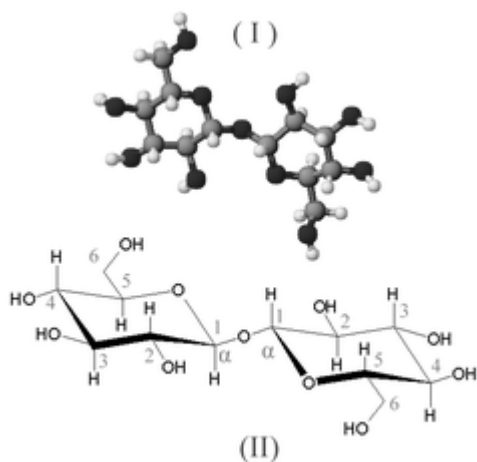
Obr. 2.: Schéma syntézy trehalózy

Trehalóza je tedy esenciální složkou energetického metabolismu hmyzu. Syntéza trehalózy byla objasněna u *Schistocerca gregaria*. Trehalóza je syntetizována z UDP-glukózy a glukózy-6-P (viz Obr. 2). Katalyzující enzymy jsou trehalóza-6-P syntáza a

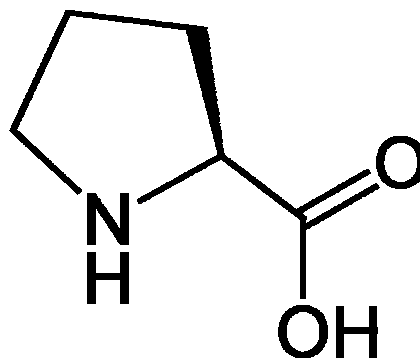
trehaloza-6-fosfatáza. Syntéza glykogenu vyžaduje UDP-glukózu také, ale aktivátorem syntézy glykogenu je glukóza-6-P. UDP-glukóza je inhibována při vysokých koncentracích trehalózy. Takže pokud je koncentrace trehalózy vysoká, je její syntéza inhibována. Naopak hladina UDP-glukózy se zvyšuje čímž se zvýší syntéza glykogenu. Pokud se například během letu koncentrace trehalózy sníží, pak její vyšší afinita k UDP-glukóze dovolí přednostní syntézu trehalózy (Beenackers et al., 1984). Syntéza trehalózy v tukovém tělese je energeticky závislý proces. Studie na dvou druzích švábů ukázaly, že syntéza a uvolňování trehalózy je spojeno s oxidací mastných kyselin. Ve skutečnosti snížení  $\beta$ -oxidace zabraňuje AKH-indukované uvolnění trehalózy (Arrese and Soulages, 2010).

Prolin je bohatý substrát nalezený téměř u všech druhů hmyzu. Je syntetizován v tukovém tělese z acetyl-CoA a alaninu a poté uvolňován do hemolymfy. U hmyzu jako například u mandelinek a mouchy tse-tse je prolin používán jako primární energetický zdroj především díky enzymatické výbavě mitochondrií ve svalech, která je nezbytná pro oxidaci prolinu, a také protože má tento hmyz sníženou schopnost oxidace mastných kyselin a pyruvátu. Využití prolinu v průběhu letu je doprovázeno zvýšenou koncentrací alaninu v hemolymfě. Alanin je znovu použit pro syntézu prolinu. V tukovém tělese tedy funguje jako transportní element přepravy acetátových jednotek z tukového tělesa do svalů (Beenackers et al., 1984; Arrese and Soulages, 2010).

Glykogen se mobilizuje pro užití tkání hlavně formou trehalózy. Spotřeba glykogenu závisí na aktivitě glykogen-fosforylázy, která poskytuje glykosylové zbytky pro syntézu trehalózy. Míra fosforylace se v tukovém tělese zvyšuje během larválního vývoje. Tento nárůst před kuklením je spojeno se spotřebou energie pro syntézu chitinu, jehož je glykogen prekurzorem (Arrese and Soulages, 2010).

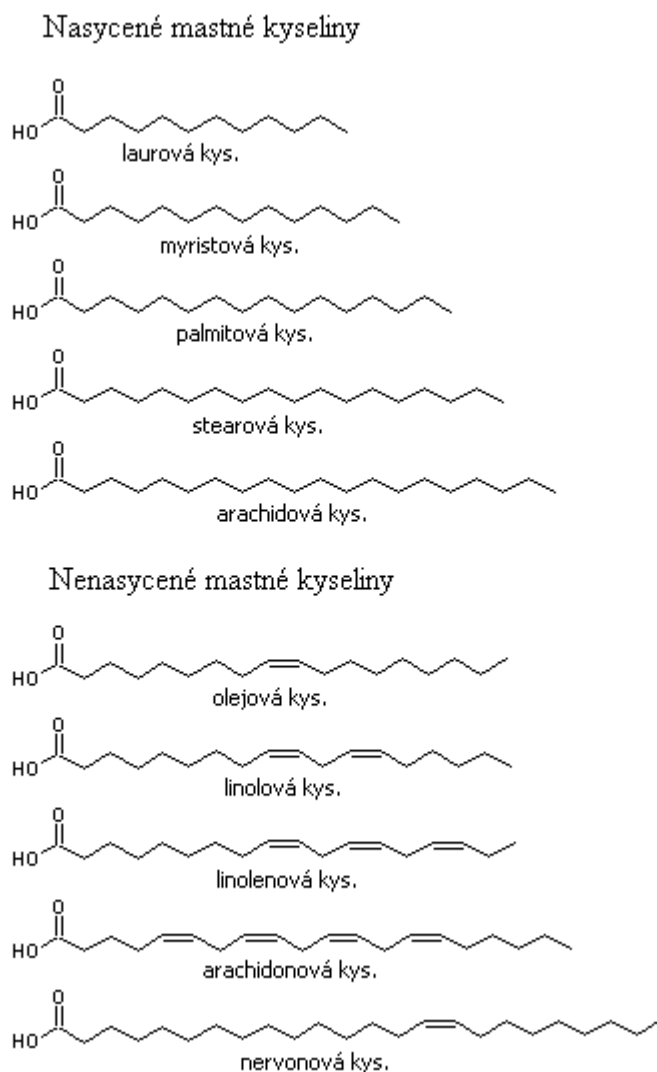


**Obr. 3.:** Trehalóza



**Obr. 4.:** Prolin

Mobilizace glykogenu je závislá na aktivitě glykogen-fosforylázy, která katalyzuje odbourávání glykogenu na glukózu-1-fosfát. AKH stimuluje aktivaci glykogen-fosforylázy v tukovém tělese pomocí fosforylace proteinu, který převádí B formu (aktivní pouze v přítomnosti AMP (adenosinmonofosfátu) na A formu (aktivní samu o sobě), což znamená, že tukové těleso je schopné měnit glykogen na trehalózu v závislosti na potřebách jiných tkání (Arrese and Soulages, 2010).



**Obr. 5:** Nasycené a nenasycené mastné kyseliny

Dalším významným zdrojem energie jsou bezpochyby již zmíněné lipidy. Analýzou extraktů lipidů se zjistilo, že hlavní lipidickou složkou v tělech organismů jsou TAG, které slouží především jako zásobárna energie, jež může být spotřebována nebo uložena podle momentálních požadavků organismu. TAG jsou proto hlavním zdrojem energie při období, které neumožňuje krmení jedince (Downer, 1978; 1985). Nejvíce energie z TAG je uloženo

v částech mastných kyselin, která je získávána pomocí procesu  $\beta$ -oxidace. V jednom druhu hmyzu bylo identifikováno 23 druhů mastných kyselin, nicméně většinou se na obsahu podílí 8 mastných kyselin a to: nasycené (myristová, palmitová, stearová), 1-nenasycené (myristylová, palmitoleová, olejová) a n-nenasycené (linolová, linoleová) (Downer, 1985). Transportní formou lipidů jsou DAG putující hemolymfou uložené v lipophorinu. 90% DAG v hemolymfě je v podobě 1,2 isomeru (Beenackers et al., 1984; Arrese et al., 2000). Mastné kyseliny také slouží jako prekurzory při syntéze eikosanoidů, feromonů a jsou nezbytné i na syntézu fosfolipidů a vosků.

### 3.1.2.2 Hormonální řízení mobilizace energie – AKH

Metabolismus lipidů je u hmyzu řízen hormonálně. Zajišťují to hormony AKH – adipokinetické hormony, malé okta, nona nebo dekapeptidy patřící do Red pigment concentrating hormone (RPCH) rodiny. Oba konce malého peptidu jsou blokovány, na N – konci kyselinou pyroglutamovou a C – konec je amidový. Nazývají se stresové hormony, protože slouží k uvolňování energie, potřebné při vysoké zátěži organismus, například při dlouhém letu. AKH hormony se syntetizují v *corpora cardiaca*, odkud jsou vyplavovány při zvýšené energetické potřebě organismu. Cílovým orgánem vyplavených AKH je tukové těleso. Tyto hormony aktivují mobilizaci metabolismu tuků z tukového tělesa (Downer, 1985; Arrese et al., 2000 and 2010; Kodrik et al, 2000; Goldsworthy et al., 2002; Kodřík, 2008).

### 3.1.3 Regulace metabolismu lipidů

Pokud se adipokinetické hormony z *corpora cardiaca* dostanou do hemocoelu, zvyšují koncentraci DAG v hemolymfě. *Corpus cardiaca* je místo ukládání mozkových neurosekretů a anatomicky jde o oblast žlázového regionu. AKH jsou tedy vypouštěny z *corpora cardiaca* jako odezva na požadavky energie organismu, respektive jeho létacích svalů. Injekce trehalózy nebo lipidů do hemocoelu *Locusta migratoria* snižuje množství AKH. Jako hlavní iniciátor uvolňování AKH je navrhován oktopamin. Pokusy také indikují, že tento biogenní amin možná slouží k vypouštění hormonů zprostředkovaném přes oktopamin-citlivým adenylát cyklázovými receptory, které se nacházejí na buněčné membráně specifických buněk v *corpora cardiaca*. Čili po zvýšení hladiny oktopaminu, které následuje po začátku letu, nastává nabuzení organismu a je podporována sekrece AKH z *corpora cardiaca*. Následné snížení hladiny oktopaminu asi po 15 až 30 minutách letu je doprovázeno snížením hladiny trehalózy v hemocoelu, což vede k zvýšení tvorby AKH. AKH tedy indukuje zvýšení

hemocelárních DAG z rezerv odebraných z tukového tělesa ve formě TAG (Roger G. H. Downer, 1985).

Působení oktopaminu bylo také zkoumáno pomocí inkubace *corpora cardiaca* se samotným oktopaminem, avšak jeho vliv na sekreci AKH při této *in vitro* studii se nepodařilo prokázat (Arrese and Soulages, 2010).

Studie mobilizace DAG pomocí AKH prokázaly tyto skutečnosti: 1. Distribuce jednotlivých DAG v nmol/ ml v hemolymfě po aplikaci adipokinetického hormonu je rozdílná. 2. Jednotlivé Locmi AKHs stimulují u *Locusta migratoria* také různé mastné kyseliny a to především C16 a C18. 3. FAs tukového tělesa s řetězcem delším než C18 se neúčastní mobilizace tuků (Tomčala et al., 2010).

AKHs mobilizují lipidy prostřednictvím transdukce signálu. Kaskáda je iniciována díky AKHs, které se po uvolnění z *corpora cardiaca* do hemolymfy naváží na G protein spojený s receptorem. Tento proces vede ke konformační změně G proteinu, který aktivuje adenylátcyklázu, výsledně zvyšující vnitrobuněčnou úroveň cyklického adenosin-monofosfátu (cAMP). Tento sekundární posel společně s vnitro a vněbuněčným  $Ca^{2+}$  aktivuje TAG-lipázu, a ta štěpí přítomné TAG na 1,2 DAGs, které jsou transportovány k cílovým tkáním pomocí transportní partikule lipophorinu (Beenackers et al., 1984; Arrese et al., 2001; Canavoso et al., 2001).

U *Locusta migratoria* signál transdukce AKH I, II a III asi zahrnuje také formace cAMP. Zvýšení cAMP a aktivace fosforylázy závisí na přítomnosti extracelulárního  $Ca^{2+}$ . Při absenci  $Ca^{2+}$  v médiu (*in vitro* pokus) nenastala žádná fosforylace, přestože koncentrace  $Ca^{2+}$  okolo 1,5 mM v médiu byla vhodná k maximální aktivaci každého z hormonů. Mimoto se dokázalo, že AKH I, II a III zvýšily přítok iontů extracelulárního  $Ca^{2+}$  do tukového tělesa. (Vroemen et al., 1995).

*Corpus cardiaca* sarančete *Locusta migratoria* syntetizuje 3 strukturně podobné hormony, přičemž všechny 3 jsou schopné aktivovat glykogen fosforylázu z tukového tělesa. Potenciál hormonů je rozdílný, AKH III zahrnuje nejsilnější a AKH I nejslabší cAMP formaci. Zatímco aktivace fosforylázy díky AKH vyžaduje extracelulární  $Ca^{2+}$ , aktivace díky zvýšenému cAMP je nezávislá na extracelulárním  $Ca^{2+}$ . Přítok vápenatých iontů byl prokazatelně zvýšen každým z AKH (I až III), ale nebyly patrné žádné rozdíly mezi nimi (Vroemen et al., 1995).

Mobilizace energetických rezerv se také aktivuje při akutní stresové reakci hmyzu. Tato reakce je řízena neurohormonem oktopaminem, což je protějšek obratlovčího noradrenalinu. Aktivita oktopaminu je zprostředkována pomocí G-protein-vázaných receptorů, které jsou spojeny buď se snížením nebo se zvýšením intracelulární hladiny cAMP nebo s generováním

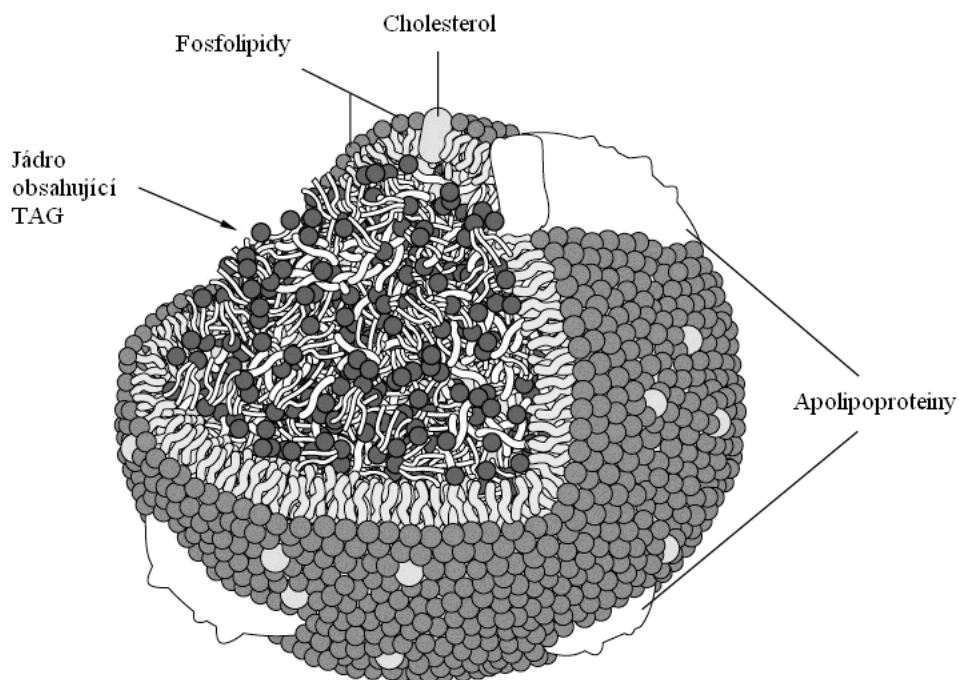
intracelulárního signálu vápníku. Oktopamin stimuluje mobilizaci lipidů u mnoha druhů, ale odezva je nízká ve srovnání s odezvou na AKH (Arrese and Soulages, 2010).

### 3.1.4 Transport lipidů

Lipidy hmyzí hemolymfy jsou ve vodě nerozpustné. Stejně tak DAG nejsou v hemolymfě jako volné molekuly, ale jako komponenty makromolekulárních komplexů – lipoproteidů, u hmyzu zvaných lipophorinů. Jedná se hlavně o dvě skupiny: diglycerid-nosící-lipoproteiny I a II (DGLp I a DGLp II). DGLP I přijímá DAG z tukového tělesa a volný sterol ze střeva a funguje jako přenašeč těchto substrátů mezi tkáněmi. Druhý lipoprotein DGLp II nebere DAG z tukového tělesa. Byl nalezen pouze u samiček v kuklách a jeho hladina se zvyšuje v době vývoje vaječnicků. Proto se usuzuje, že funguje jako vitellogenin (Downer, 1978).

Lipophorin je hlavním lipoproteinem nalezeným v hemolymfě hmyzu. Skládá se na povrchu z fosfolipidů a proteinů. Fosfolipidy jsou esenciální složkou membrán a jsou tedy přítomny ve všech druzích tkání. Bylo dokázáno, že PC (fosfatidylcholin) a PE (fosfatidyletanolaminy) jsou majoritní složkou u hmyzu a zaručují okolo 70% z celkových fosfolipidů (Downer, 1985; Canavoso et al., 2001).

DAGs jsou převládající neutrální lipidy lipophorinu, ten dále obsahuje nižší množství sterolů, uhlovodíků, karotenoidů a dalších acylglycerolů. Lipophoriny DGLp I se nejčastěji vyskytují v podobě high density lipophorin (HDLp) -  $D \sim 1,15 \text{ g/ml}$ . Každá částice HDLp se skládá ze dvou apolipoproteinů: apolipophorinu I (ApoLp I) - 250 kDa a apolipophorinu II (ApoLp II) - 70 kDa. Apolipophorin III (ApoLp I III) - 18 kDa je volně v hemolymfě nebo spojen s LDLp (low density lipophorin,  $\sim 1,03 \text{ g/ml}$ ) a má především stabilizující funkci. Složení lipidů v jádře LDLp je rozdílné u různých druhů hmyzu. Lipidy nejčastěji přenášené lipophorinem jsou DAG, nicméně třeba u některých druhů skupiny diptera (*Aedes aegypti*) jde spíše o TAG. LDLp také transportuje i malé procento sterolů, volných mastných kyselin (FFAs), karotenoidů, monoacylglycerolů (MAGs), atd.. ApoLp I, II jsou syntetizovány v tukovém tělese (Arrese et al., 2001; Canavoso et al., 2001).



**Obr. 6.:** Lipophorin

Lipophoriny jsou také známé u obratlovců a to až několik druhů. Jakmile doručí určený lipid na místo spotřeby, dochází k jejich dezintegraci a úplné degeneraci. Hmyzí lipoproteiny se na rozdíl od obratlovcích po doručení DG na místo spotřeby nerozpadají, ale recyklují se, nedochází k jejich degradaci. Obratlovcí lipophoriny jsou specializované na specifický druh substrátu, kdežto jeden hmyzí lipophorin může transportovat rozličné třídy lipidů k rozličným místům v organismu. V podstatě to znamená, že produkce hmyzího LDLp je regulována dostupností DAG a nikoliv translací apolipoproteinu II (Canavoso et al., 2001).

### 3.1.5 Příjem energie v podobě lipidů

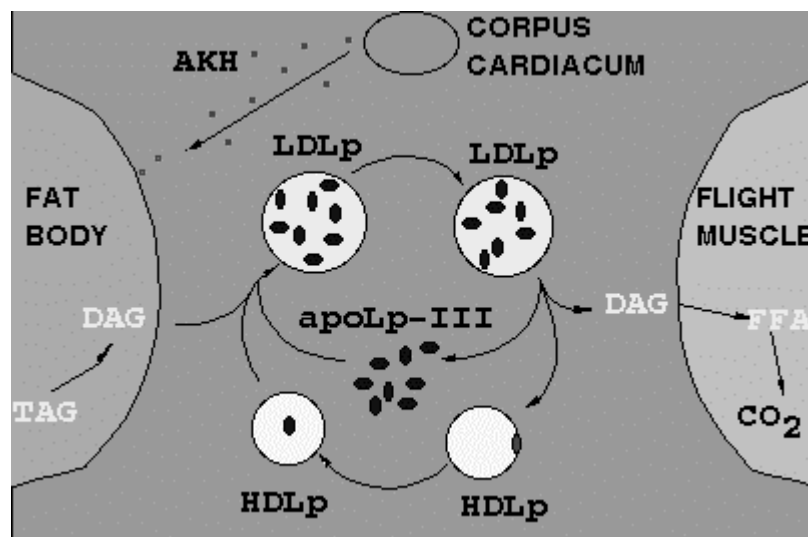
Jednou z hlavních funkcí střeva je strávit přijaté lipidy, absorbovat a zpracovávat strávené produkty k exportu do hemolymfy. Většinou lipidovou složkou potravy a zároveň majoritní formou pro ukládání mastných kyselin jsou TAGs. Export lipidů z enterocytů ve střevě u hmyzu se liší od obratlovcího ve dvou důležitých cestách: 1. DAGs jsou hlavní transportovanou formou lipidů, u obratlovců jsou to FFAs, a 2. uvolňování DAGs nezahrnuje syntézu lipoproteinové částice ve střevě, ale spíše je DAG vypouštěn přímo do existujícího lipophorinu v hemolymfě.

Regulace exportu DAGs ze střeva zahrnuje integraci několika procesů: 1. mechanismy trávení a absorpce lipidů uvnitř lumenu střeva, 2. cesty pro syntézu DAG v enterocytech a 3. mechanismy přenosu DAG z enterocytu na lipophorin v hemolymfě.

Proces trávení v lumenu středního střeva představuje kompletní hydrolyzu TAG na glycerol a mastné kyseliny a formování FFAs a MAGs.

Lipidový transport uvnitř epitelálních buněk střeva je zprostředkován specifickými vnitrobuněčnými proteiny vážící na sebe mastné kyseliny například u *Manduca sexta* nebo lutein vážící protein u *Bombyx mori*. Jejich funkce je zatím nejasná, ale je možné, že tyto proteiny zabraňují toxickým akumulacím mastných kyselin v buňce, nebo také že mastné kyseliny vázané na proteinech jsou určeny pro specifické metabolické cesty (Arrese et al., 2001).

Přenos DAG z enterocytu do hemolymfy je velmi složitý proces. K vytvoření LDLp na membráně enterocytu dojde přenosem DAG přes membránu pomocí DAG – binding proteinu. Jakmile se DAG dostane za membránu je převzat HDLp, který za pomoci částice transportující lipidy vytvoří LDLp. Na celý lipophorinový komplex se pak naváže stabilizující apoLp-III. Jakmile je LDLp kompletní, je hemolymfou unášen buď do tukového tělesa k uložení získaných lipidů, nebo do svalů, či jiné tkáně s energetickým deficitem (Obr. 7.). Po té co dojde ke kontaktu s cílovou tkání, je DAG hydrolyzován lipophorinovou lipázou, odtrhne se apoLp-III a vzniká HDLp, který je pak hemolymfou unášen buď k enterocytu střevního lumenu nebo k tukovému tělesu (Canavoso et al., 2001).



Obr. 7.: Koloběh lipophorinu při přenosu DAG



### 3.1.6 Výdej energie

Tukové těleso mobilizuje lipidy ve formě DAG. *Corpora cardiaca* kontroluje lipidovou mobilizaci z tukového tělesa prostřednictvím vyloučených AKH. Obsah MAG v tukovém tělese zůstává nezměněn po aktivaci DAG syntézy díky AKH. Jedinou prokazatelnou změnou mezi lipidovými komponenty v tukovém tělese indukovanými díky AKH je akumulace sn-1,2-DAG. Bylo prokázáno, že AKH rapidně indukuje zvýšení A-kinázové aktivity, což předchází aktivaci TAG-lipázy tukového tělesa a mobilizaci DAG v hemolymfě. Vnitrobuněčné umístění TAG-lipázy tukového tělesa je v cytosolu. Aktivace lipolýzy vyžaduje přemístění této lipázy z cytosolu k substrátu uzavřeném v tukových kapénkách. Mobilizace lipidů tedy zahrnuje dva důležité procesy. 1. hydrolýzu uložených TAG na transportní DAG a 2. transport DAG z tukových kapének do hemolymfy pomocí cytosolového přenašeče (Arrese et al., 2000).

Jako počáteční událost při využívání lipidů z tukového tělesa jako zdroje energie je tedy hydrolýza TAG pomocí lipáz, přičemž se produkuje DAG z TAG a navrhují se 2 cesty:

1. monoacylový rozštěp uložených TAG jako primární cesta produkce 1,2-DG a 2. degradace TG na 2-monoacylglycerol (2-MG) následovaná recyklací na 1,2-DG (Beenackers et al., 1984).

Jak se ukázalo, tukové kapénky nejsou jen pasivní organela, ale jsou dynamicky aktivní. Skládají se z jádra z neutrálních lipidů (TAG a estery cholesterolu) a ty jsou obklopené jednou vrstvou fosfolipidů a cholesterolu, kde jsou ukotveny specifické bílkoviny. Při nutnosti aktivace lipidických zásob a vzhledem k malé rozpustnosti, představují fosfolipidy velkou překážku. Tento proces (rozpuštění obalové vrstvy), zdá se, kontrolují evolučně poměrně konzervované proteiny z PAT rodiny, což je skupina proteinů, která sdílí sekvenční podobnost i umístění jako tukové kapénky samotné. Hmyzí genom kóduje 2 PAT proteiny Lsd1 a Lsd2. Celková sekvenční podobnost s obratlovčí genovou rodinou je velmi malá. Nicméně informace z Lsd1 a Lsd2 ukazuje, že podporují a podílejí se na hmyzím metabolismu tuků (Arrese and Soulages, 2010).

Lsd2 působí jako bariéra pro lipázy. Zatímco studie na *Manduca sexta* ukazují, že Lsd1 hraje velkou roli při aktivaci lipolýzy. Lsd1 a Lsd2 se odlišují i fyzikálními vlastnostmi. Lsd1 je rozpustný ve vodném prostředí pokud je vázán na lipidové částici nebo v přítomnosti chaotropních látek a detergentů, nicméně Lsd2 je rozpustný ve vodném prostředí i bez detergentů. Díky tomu se předpokládá, že Lsd1 se nachází pouze spojen s lipidovými strukturami, zatímco Lsd2 může být v cytosolu (Arrese and Soulages, 2010).

Mastné kyseliny jsou uvolňovány z kapének tukového tělesa z mnoha důvodů, ať už k dodání energie do létacího svalu formou DAG, či transportu lipidů do vaječnicků a v neposlední řadě z celkové metabolické potřeby udržování energetické bilance ve všech tkáních organismu. První krok při mobilizaci lipidů spočívá v aktivitě lipázy na TAG v tukovém tělese, aby katalyzovala hydrolýzu TAG v kapénkách. Dvě lipázy byly objeveny nedávno a to insect adipose triglyceride lipase (ATGL), jinak nazývaná Brummerova lipáza a triglyceride lipase (TGL). Lipolytická aktivita AKH se spouští fosforylací Lsd1, který aktivuje TGL. Toto je v kontrastu s aktivitou Brummerovy lipázy, která je na AKH nezávislá (Arrese and Soulages, 2010).

Dalším krokem je vypouštění DAG z tukového tělesa do hemolymfy, což vyžaduje přítomnost hemolymfárního proteinového akceptoru. Dokázalo se, že přidáním proteinového syntetizujícího inhibitoru (cykloheximid), dojde během inkubace k zastavení výdeje DG do hemolymfy. Jakmile dojde k znovuvytvoření LDLp, jsou DAG transportovány do létacího svalu či jiné tkáně (Arrese et al., 2001).

Určité množství lipidů je uloženo i ve vajíčkách během procesu vitellogenese. Jejich mobilizace za pomoci lipáz vajíčka je patřičně načasovaná (Beenackers et al., 1984).

### 3.1.7. *Pyrrhocoris apterus*, morfy, adipokinetické hormony a hemocyty

Říše: živočichové (Animalia)

Kmen: členovci (Arthropoda)

Podkmen: šestinozí (Hexapoda)

Třída: hmyz (Insecta)

Řád: polokřídlí (Hemiptera)

Podřád: ploštice (Heteroptera)

Čeleď: ruměnicovití (Pyrrhocoridae)



Obr. 8.: *Pyrrhocoris apterus*

Pyrrhocoridae je rodina phytophágnych ploštíc, zahrnující asi 300 druhů. Jejich charakteristickou vlastností je varovné zbarvení. Většina druhů je spíše subtropická, ale *Pyrrhocoris apterus* je jeden z druhů žijících v temperátní zóně. *Pyrrhocoris apterus* se díky krátké generační době, nenáročným podmínkám chovu a zájmu pracovníků Entomologického ústavu stal významným fyziologickým modelem. Důležitou vlastností tohoto druhu je také jeho dimorfismus. V přírodě jsou známy dvě formy této ploštice: krátkokřídla (brachypterní) a dlouhokřídla (makropterní). Obě dvě formy se výrazně liší jak ve fyziologii tak v chování a jsou určeny geneticky, ale také závislé na prostředí. Makropterní forma je recesivní a obvykle je rozmnožování indukováno až krátkou fotoperiodou či vystavením chladu, což je také důvod proč má delší životní cyklus (Socha, 1993). V laboratoři se podařilo díky vnějším fotoperiodickým podmínkám vytvořit třetí morfu - diapauzní (Socha and Kodrlik, 1999).

Larvy procházejí pěti instary. Při běžných laboratorních podmínkách (long-day 18L:6D a 26°C) trvají první 4 instary okolo 10-14 dní, přičemž poslední pátý, trvá sám o sobě 7 až 10 dní. Ovšem v přírodě, je tento vývoj o poznání pomalejší. Dospělé samičky *P. apterus* mají pár telotropických vaječníků se sedmi ovariolami, ve kterých jsou vajíčka. Po ovulaci jsou folikuly zvrásněné (scvrklé) a formuje se žluté tělísko. Snůšky jsou kladeny v intervalech 2 až 5 dnů. Samčí pohlavní orgány se skládají ze sedmi testikulárních tubulů pokrytých membránou. Každý tubulus obsahuje skupiny buněk – spermatogonie, spermatocyty I a II, spermatidy a spermatozoidy. Páření je jednoduché, nebylo pozorováno žádné chování podobné námluvám. Sameček najde samičku pomocí čichu. Diapauzní samci nekopulují, oproti tomu diapauzní samičky, u kterých je diapauza vyvolána díky podmínkám krátkého dne, jsou schopny se pářit pokud se spárují s aktivním samcem. V přírodě životní cyklus (od vajíčka po dospělé) trvá okolo 2 až 3 měsíců. Velikost těla je okolo 6,5 – 11 mm u samečků

a 7- 12 mm u samiček. Délka života dospělé je různá, může být od 2 měsíců třeba po rok. Okolo 20 % dospělých samečků se dožívá skoro 2 let. Samičky si vyhloubí malou díru a do ní nakladou vajíčka. Během pozdního podzimu, zimy a počátku jara jsou inaktivní v humusu pod lípami. Nezralá stádia *P.apterus* se shlukují a to pomocí vizuálních a chemických stimulů. Nejčastěji preferují rostliny ze skupiny slézovitých (Malvales). *P. apterus* je fytofág, který se adaptoval na potravu ve formě zralých suchých semen. V případě chovu v zajetí se nejlépe osvědčila lipová semínka, která jim poskytují potravu ve formě rostlinných TAG. Profil FA byl velmi podobný v tukovém tělese, ovarii nebo v celém těle hmyzu, a to: linoleová (18:2) okolo 50%, olejová (18:1) okolo 20 %, palmitová (16:0) okolo 10 %, zatímco stearová, linoleová, a jiné další mají jen okolo 12 % (Joan Stadler Martin, 1969).

Některé druhy hmyzu nemohou létat i pokud jde o makropterní exempláře. Příkladem toho je také *P. apterus*. AKH stimuluje nejen let ale také pohyb po zemi. Účinky na pohybovou aktivitu *P. apterus* pomocí injekce AKH byly zaznamenány jako téměř zdvojnásobené a přitom stimulační účinek Pyrap-AKH na pohyb, časově koreloval s mobilizací lipidů (Socha and Kodrík, 1999; Goldsworthy et al., 2002). U 10 dní starých brachypterních reprodukčních samiček byla naměřena mnohem nižší odpověď na AKH než u brachypterních diapauzních anebo makropterních samiček. Jiné měření ukázalo, že AKH stimulace pohybu je u *P.apterus* nezávislé na stádiu.

U *P. apterus* dojde k maximální mobilizaci lipidů během fotofáze což koreluje i s pohybovou aktivitou. Denní průběh pohybového rytmu také koreluje s obsahem AKH v CNS. Regulace lipidů v hemolymfě zahrnuje tedy rovnováhu 3 procesů: 1. Změny v uvolnění (nebo uskladnění) AKH, dále 2. změny v počtu nebo citlivosti receptorů na AKH v buňkách tukového tělesa a nakonec také 3. změny v rozkladu a vylučování AKH (Kodrík, 2008).

Neuropeptidy AKH, byly identifikovány téměř u všech řádů hmyzu, včetně Heteroptera, kde byly dva octapeptidy Pya-AKH a Pea-CAH II objeveny nedávno (Kodrík et al., 2000).

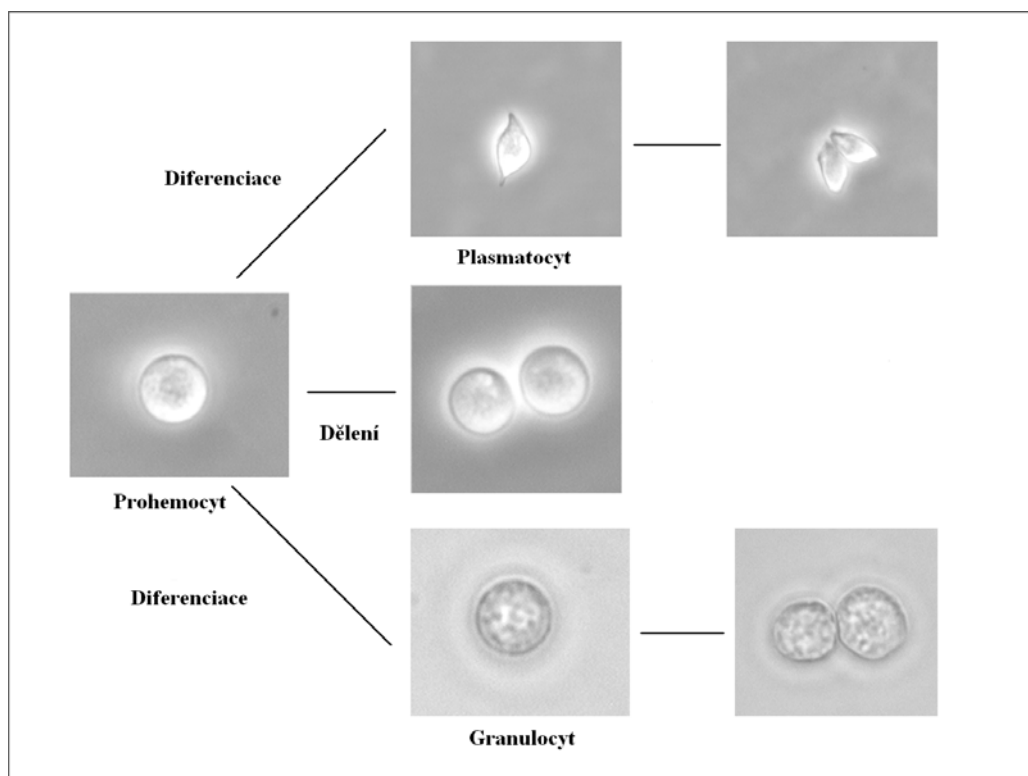
AKH neslouží jen k mobilizaci energie z tuků, ale i k aktivaci glykogenfosforylázy nebo inhibici syntézy tuků, jednoduše řečeno, stimulují katabolické reakce, činí energii dostupnější a mezitím inhibují syntézu látek (Kodrík, 2008).

U 10 dní starých brachypterních reprodukčních samiček byla naměřena mnohem nižší odpověď na AKH než u brachypterních diapauzních anebo makropterních samiček. Jiné měření ukázalo, že AKH stimulace pohybu je u *P.apterus* nezávislé na stádiu.

Profil FA byl velmi podobný v tukovém tělese, ovarii nebo v celém těle hmyzu, a to: linoleová (18:2) okolo 50%, olejová (18:1) okolo 20 %, palmitová (16:0) okolo 10 %, zatímco stearová, linoleová, a jiné další mají jen okolo 12 % (Joan Stadler Martin, 1969).

Hlavními hemolymfálními lipidy jsou již zmíněné DAGs, které jsou nesené LDLp. Lipophoriny však nejsou jedinou složkou hemolymfy. Majoritní složku tvoří cirkulující hemocyty, které hrají důležitou roli při obranných mechanismech proti mikroorganismům v hemocelu. Jde o hemocyt-zprostředkovanou reakci jako je fagocytoza, nodulace a zapouzdrnění. Mezi nejčastější hemocyty patří prohemocyty, plasmocyty, granulocyty, spherulocyty, adipocyty a oenocyty.

V hemolymfě *P. apterus* byly nalezeny 4 druhy hemocytů: prohemocyty (15-29%), plasmocyty (23-40%), granulocyty (34-60%) a spherulocyty (0-4%), přičemž nebyl pozorován prokazatelný rozdíl mezi pohlavími. Prehemocyty jsou malé kulaté až eliptické, přičemž jádro téměř zaplňuje buňku. Obsahují pár mitochondrií a malé množství endoplazmatického retikula. Jsou podobné obratlovčím lymfocytům. Plasmocyty mají protáhlý tvar. Jejich jádro je také protáhlé a obsahuje masivní jadérko. Mají více endoplazmatického retikula. Obsahují i vakuoly. Granulocyty jsou nejčastějším typem hemocytů u dospělých *P. apterus*. Cytoplazma je bazofilní a obsahuje granule. Granulocyty jsou nejnápadněji odlišitelné od ostatních hemocytů (Berger and Slavíčková, 2008).



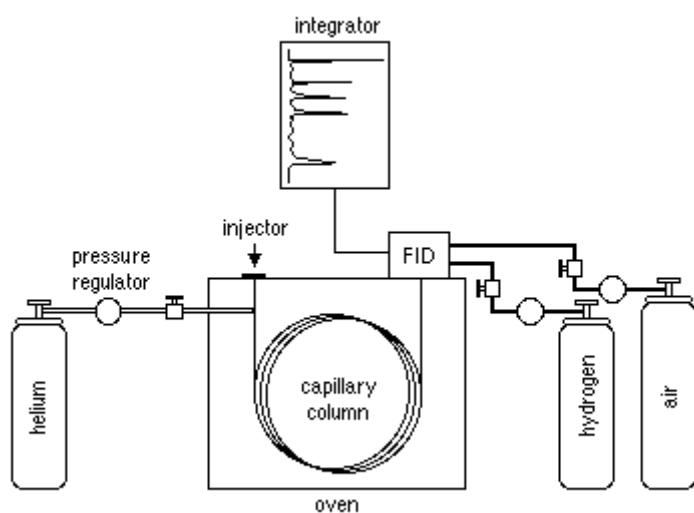
**Obr. 9.:** Hemocyty u hmyzu

## 3.2 Chemická část

### 3.2.1 Plynová chromatografie/ s plamenově ionizačním detektorem (Gas chromatography/Flame ionization detektor GC/ FID)

Chromatografie patří mezi nejrozšířenější analytické metody poskytující kvalitativní a kvantitativní informaci o jednotlivých složkách směsi. Slouží k identifikaci, separaci a stanovení velkého množství jak organických tak anorganických látek. Rozdělení chromatografických metod není zcela jednoznačné, protože se někdy uplatňuje současně více mechanismů. Dělení může být založeno třeba na druhu skupenství mobilní a stacionární fáze (Schneedorferová, 2009).

Mezi její charakteristiky patří jednoduchost, citlivost a vysoká separační účinnost. Využívá se k identifikaci nejen plynů, ale i látek, které lze převést na páry. Podle druhu stacionární fáze dělíme GC na Gas-Liquid Chromatography (GLC), kde je stacionární fáze kapalina zakotvená na nosiči, a Gas-Solid Chromatography (GSC), kde je touto fází tuhá látka. Není velký rozdíl v pracovním postupu ani konstrukci zařízení, ale v principu dělení. V případě GSC se látky dělí na základě rozdílné absorpční schopnosti jednotlivých složek, u GLC je principem rozdělování látek mezi nosným plynem a kapalinou na inertním nosiči (Schneedorferová, 2009).



Obr. 10.: Schéma GC/FID



Obr. 11.: FID - Shimadzu

Zdrojem nosného plynu býva najčastejši tlaková nádoba spojená se zařízením na čištění plynu, regulaci a měření tlaku. Poté následuje zařízení pro dávkování vzorku, které jej vpraví do proudu nosného plynu a pokračuje s ním do kolony. Z kolony jde směs do detektoru, poté do vyhodnocovacího zařízení. Součástí chromatografu je termostat, který udržuje přesnou teplotu dávkovače, kolony a detektoru

*([http://en.wikipedia.org/wiki/Flame\\_ionization\\_detector](http://en.wikipedia.org/wiki/Flame_ionization_detector)).*

Plyn z chromatografické kolony je zaváděn do kyslíko-vodíkového plamene, kde probíhají chemionizační reakce vedoucí ke vzniku nabitých částic. Dochází ke vzniku elektrického proudu. Měří se zde ionizační účinnost hoření. FID poskytuje odezvu téměř na všechny organické látky (u uhlovodíků je odezva úměrná počtu uhlíkových atomů v molekule) *([http://tomcat.prf.jcu.cz/sima/analyticka\\_chemie/separb.htm](http://tomcat.prf.jcu.cz/sima/analyticka_chemie/separb.htm)).*

Nevýhodou techniky FID je to, že po měření dochází k zničení všech zkoumaných komponent, tudíž další měření vzorku není možné, proto se užívá jako terminální detektor.

### **3.2.2 Extrakce na tuhou fázi (Solid phase extraction – SPE)**

SPE je metoda, která slouží k přípravě vzorků, což je velmi důležitá fáze chromatografické analýzy. Princip SPE je podobný jako u kapalinové chromatografie. Analýzy, které nás zajímají, jsou v kapalně fázi zadržovány na tuhém sorbetu. Tuhý sorbent je uložen v SPE kolonkách a má větší zrnění, než sorbent v kapalinové chromatografii, proto je možné pracovat při nízkém podtlaku. Tato metoda má určité výhody, jako selektivnost, reprodukovatelnost, jednoduché provedení, možnost zpracování více vzorků najednou, nízká spotřeba organických rozpouštědel a časová nenáročnost. Důležitou roli zde hraje volba kolonky (sorbentu). Sorbenty využívané v SPE jsou podobné sorbentům v kapalinové chromatografii (normální, reverzní nebo iontově-výměnné fáze). SPE se nejčastejši používá k čištění vzorků (Schneedorferová, 2009).

SPE využívá afinity mobilní fáze, která se vstřikuje na fázi stacionární umístěnou v různých typech kolonek. Většina SPE zařízení je vybavena vakuovým portem, což celou techniku značně urychluje. Většina stacionárních fází je založena na bázi oxidu křemičitého, na který se nadále váží konkrétní funkční skupiny

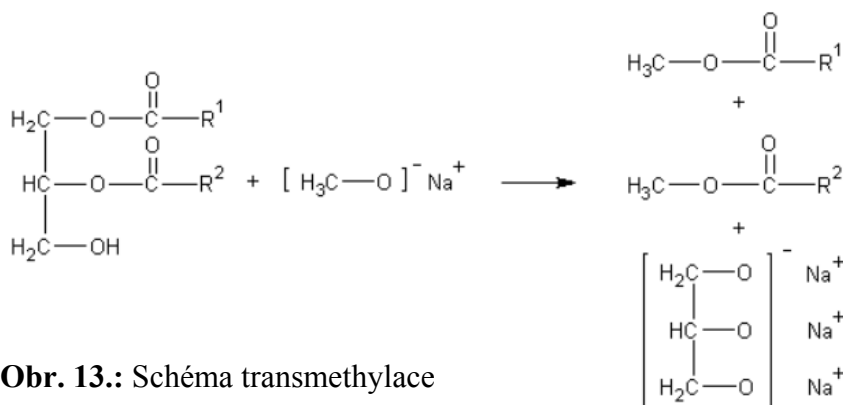
*([http://en.wikipedia.org/wiki/Solid\\_phase\\_extraction](http://en.wikipedia.org/wiki/Solid_phase_extraction)).*



**Obr. 12.:** Vakuové zařízení pro SPE

### 3.2.3 Transesterifikace

V plynové chromatografii je esterifikace nejobvyklejší derivatizační reakcí. Estery patří k látkám s dobrými chromatografickými vlastnostmi (jsou těkavější než jim odpovídající kyseliny, netvoří vodíkové můstky a nedimerizují nebo nedisociují). Nejvíce těkavé a nejčastěji připravované jsou methylestery mastných kyselin (FAME) (<http://en.wikipedia.org/wiki/Transesterification>).



**Obr. 13.:** Schéma transmethylace

Derivatizace slouží jinak ke zlepšení nebo dokonce umožnění analýzy. Jde zde o určité zavedení atomů nebo funkčních skupin do molekuly analyzované látky a tím její převedení na látku s odlišnými vlastnostmi. Vzniká sloučenina podobná výchozí látce, tj. derivát, který má jiné funkční skupiny a to má za následek rozdílnou reaktivitu, rozpustnost a jiné (<http://en.wikipedia.org/wiki/Derivatization>).



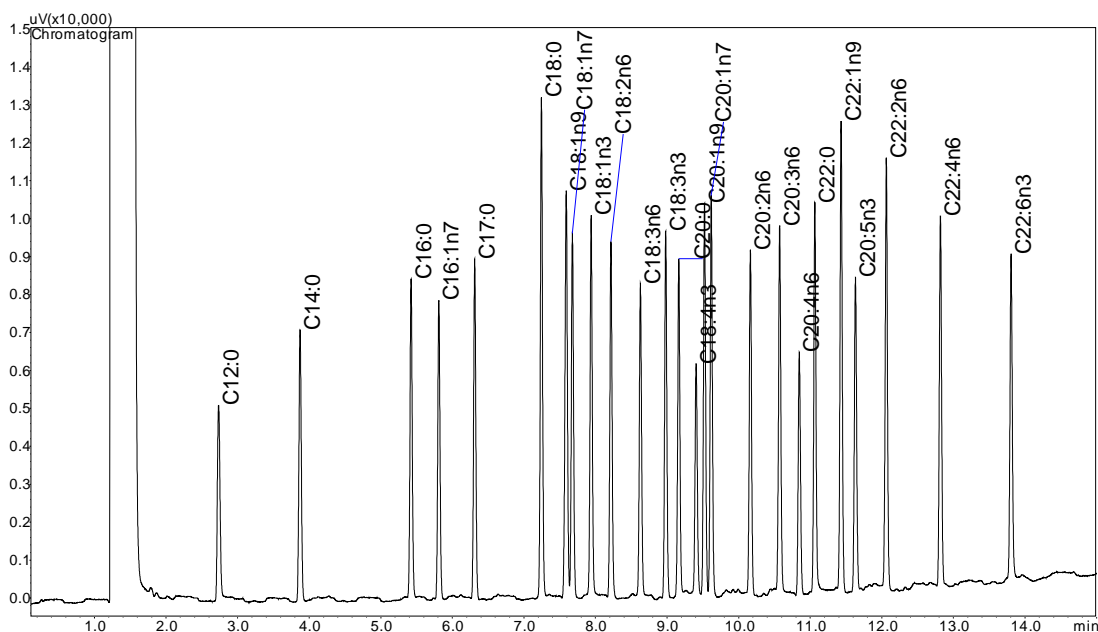
## 4. Praktická část

### 4.1 Metodika GC/FID

Pro analýzu mastných kyselin pomocí GC/FID je nutné, aby byly mastné kyseliny převedeny na jejich methylestery. To zajišťuje předchozí krok derivatizace methanolátem sodným. Vzorek byl pomocí autosampleru (AOC – 20S, Shimadzu) a injektoru (AOC – 20i, Shimadzu) vstříknut na kolonu BPX-70 (SGE) do přístroje GC-2014 (Shimadzu). Kolona byla kondicionována na 140°C a v průběhu patnáctiminutové analýzy kontinuálně zahřívána na 230°C, což je dostatečný retenční čas a teplota i k eluci mastných kyselin s 22 uhlíky.

#### 4.1.1 Práce s definovanými standardy methylesterů mastných kyselin

Při analýze pomocí GC/FID je identifikačním atributem retenční čas. Pro zjištění jednotlivých retenčních časů mastných kyselin byly naměřeny vzorky obsahující pouze jedinou mastnou kyselinu. Na základě těchto naměřených dat bylo možno určit pořadí jednotlivých mastných kyselin v průběhu chromatografické analýzy. Výsledek je prezentován na chromatogramu (Obr. 14).



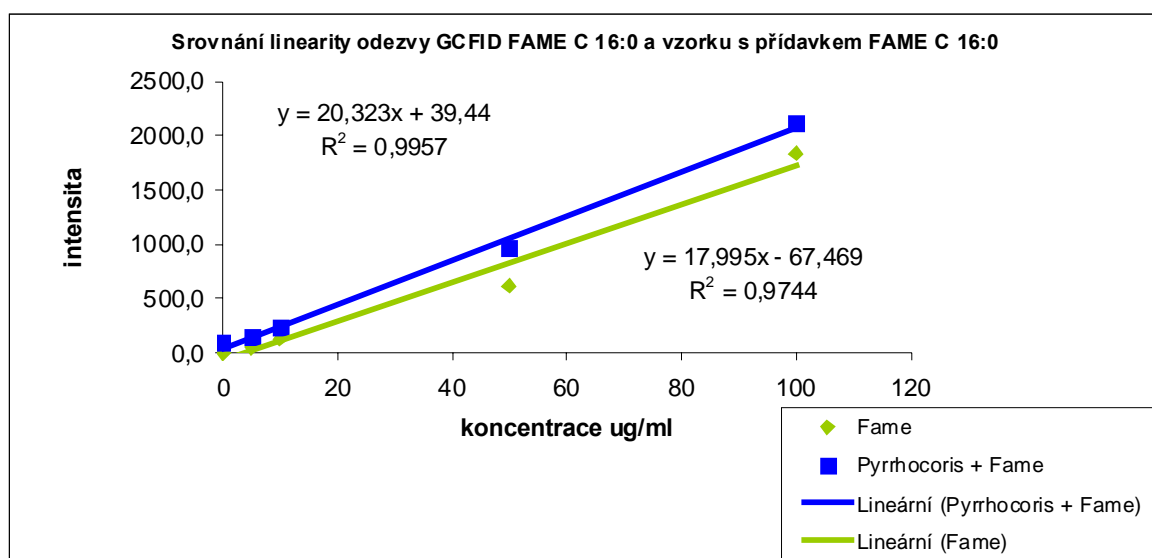
Obr. 14.: Chromatografie standardů FAME

Z příloženého chromatogramu je patrné, že eluce jednotlivým mastných kyselin je ovlivněna dvěma faktory. Prvním z nich je délka uhlíkového řetězce mastné kyseliny a druhým je množství dvojných nenasycených vazeb. Čím vyšší je množství uhlíků tím je retenční čas delší a totéž platí i o množství nenasycených vazeb, čím je jejich počet větší, tím

je také delší retenční čas. Při větších počtech dvojných vazeb můžeme dokonce pozorovat prodloužení retenčního času větší, než u mastných kyselin vyšším počtem uhlíků tzn., že mastná kyselina C 22:00 se předbílá před C 20:5n3.

#### 4.1.2 Linearita odezvy FID ve fyziologických koncentracích analytu

Opakovatelnost metody byla prověřena metodou standardního přídávku a je vyjádřena na grafu (Obr. 15).



**Obr. 15.:** Graf je závislostí koncentrace methylesteru mastné kyseliny na odezvě FIDu. Jednotlivé hodnoty jsou proloženy lineární křivkou.

Modrá (horní) křivka na reprezentuje vzorek získaný z hemolymfy *Pyrrhocoris apterus* s přídávkem vnitřního standardu methylesteru kyseliny palmitové (C16:0) a to v koncentracích 5, 10, 50 a 100 µg/mg. Zelená křivka představuje čistý standard ve stejných koncentracích. Indexy korelace křivek jsou blízké krajní hodnotě a nabývají hodnot 0,9957 a 0,9744. R se blíží k jedné, což znamená, že jsou téměř všechny body na regresní přímce a chyba měření není výrazná. Na grafu lze také v rámci fyziologických koncentrací mastných kyselin pozorovat rovnoběžnost obou přímek, což poukazuje na linearitu odezvy detektoru v oblasti koncentrace vzorku.

#### 4.2 Extrakce lipidů ze vzorku

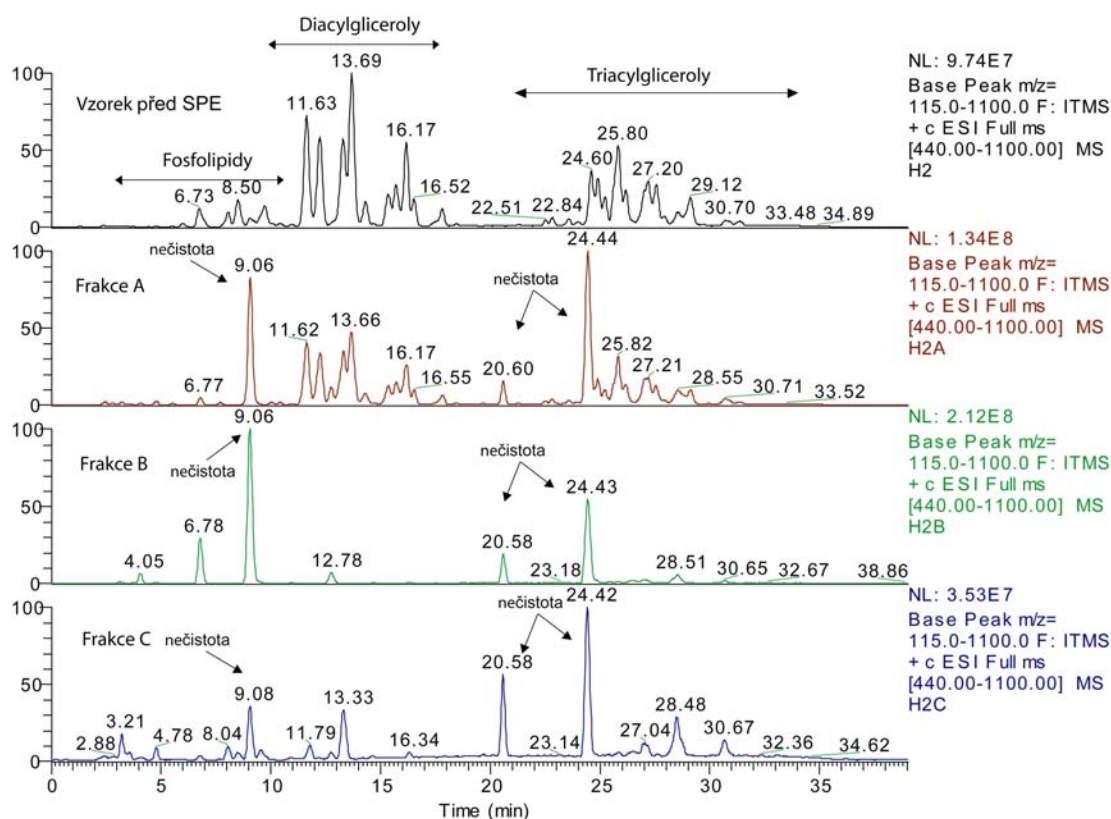
Pro extrakci lipidů z biologického materiálu, v našem případě se jednalo o hemolymfu, tukové těleso a ovária ruměnice pospolné (*Pyrrhocoris apterus*), jsme použili metodu podle

Folcha (Folch *et al.*, 1957) upravenou Košťálem a Šimkem (Košťál a Šimek, 1998) (viz příloha 2).

### 4.3 Metoda SPE

Přínos SPE metody spočívá v oddělení samotných metabolicky důležitých látek diacylglycerolů od jejich přenašečů v hemolymfě reprezentovaných lipoproteinem, který obsahuje fosfolipidy. Při samotné transmethylsterifikaci dochází ke štěpení esterových vazeb mezi glycerolem a mastnou kyselinou a nahrazení glycerolu methylem, čímž vzniká v systému GC/FID měřitelný methylester mastné kyseliny. Tento proces funguje u všech glycerolipidů, tedy jak u diacylglycerolů tak u fosfolipidů. Bez SPE by byl výsledek zkreslen přítomností mastných kyselin vyštěpených z fosfolipidů a nikoliv, jak je naším cílem, pouze z diacylglycerolů. SPE tukového tělesa ani ovária nebylo potřeba, jelikož cílové analyty, TAGs svou četností mnohonásobně převyšují jinou lipidickou složku, jako jsou fosfolipidy (PLs) nebo DAGs.

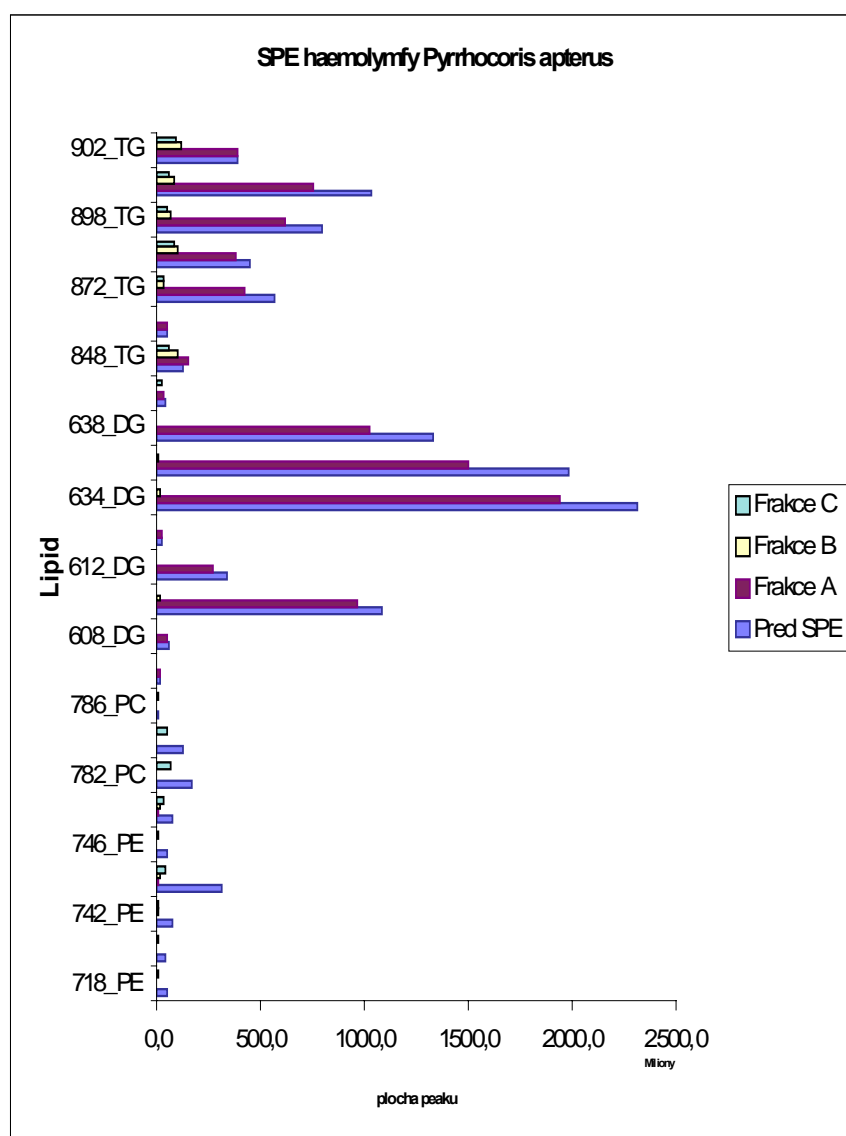
Výsledný extrakt byl pak pomocí metody SPE (viz příloha 3) rozdělen na tři frakce. Kvalitativní analýza jednotlivých frakcí byla provedena metodou HPLC MS. Znázornění čtyř chromatogramů viz Obr. 16.



**Obr. 16.:** Čtyři chromatogramy reprezentují záznam z HPLC/MS vzorku před SPE a jednotlivých frakcí po SPE.

Na prvním chromatogramu je extrakt hemolymfy *Pyrrhocoris apterus*, po aplikaci AKH. Je zde patrné vysoké zastoupení diacylglycerolů, což je pro vzorky hemolymfy běžné. První z frakcí značená jako A, obsahuje hlavně nepolární lipidy a to DAGs a TAGs. Ve frakci B jsou obsaženy volné mastné kyseliny ty byly prokázány Mgr. J. Okrouhlikem na scintilačním přístroji (osobní sdělení). Chromatografický záznam frakce B z HPLC/MS obsahuje v podstatě pouze nečistoty, jelikož u volných mastných kyselin nedochází k ionizaci, tudíž je pomocí této metody nelze detekovat. Ve třetí frakci C se eluují polární lipidy a to především fosfatidyletanolamin (PE) a fosfatidylcholin (PC).

Byla také provedena kvantitativní analýza prováděného SPE při 10 opakování. Všešlý graf je prezentován viz Obr. 17.



**Obr. 17.:** Na grafu je prezentováno 26 nejhojnějších lipidů v heamolymfě *Pyrrhocoris apterus*. Hodnoty na ose x vyjadřují integrované plochy píků lipidů čili jejich zastoupení v jednotlivých frakcích SPE.

Na grafu je patrné, že největší zastoupení ve vzorku hemolymfy mají DG. Po provedení SPE se valná většina nepolárních lipidů (TG 89,2 % výtěžnost s odchylkou 14,5% a DG 84,6% výtěžnost a odchylka 7%) eluuje ve frakci A. Přítomnost TG lze pozorovat i ve frakcích C a B U polárních lipidů je situace složitější, výtěžnosti zdaleka nedosahují takových procent (PE 11,7% s odchylkou 2,7% a PC 56,7% s odchylkou 35,1%). Je pravděpodobné, že dochází k zadržení fosfolipidů v kolonce SPE, proto musí být poslední krok SPE ještě doladě.

#### **4.4 Metodika transesterifikace**

Jelikož je naše práce zaměřena na sledování dynamiky mastných kyselin v diacylglycerolech aktivovaných u hmyzu po podání AKH, pro transmethylsterifikaci byla použita pouze SPE frakce A (viz příloha 4). Pro přípravu vzorků tukového tělesa a ovária jsme použili přímo surový extrakt bez SPE.

Pro opakovatelnost celé metodické části je nanejvýše důležité, aby byly použity přesně chemikálie, které jsou níže uvedeny (viz příloha 1). Jakékoliv nahrazení jinou látkou byť třeba pouze změna výrobce, by mohlo vést ke zhoršení ba přímo dokonce k nefunkčnosti těchto metod .

## 5. Diskuse

Metoda ke stanovení obsahu mastných kyselin pomocí GC/FID trvá jen 15 minut což je srovnatelný čas s ostatními publikacemi (Zhao et al., 2007; Massod and Salem, 2008). Vyhodnocování probíhá za použití metody vnitřního standardu a na základě ploch píků methylesterů příslušných mastných kyselin. Technika plynové chromatografie s využitím plamenového ionizačního detektoru se ukazuje jako velmi vhodná k analýze methylesterů mastných kyselin. Námi získané eluční pořadí FAME je obdobné jako u chromatogramů prezentovaných v publikaci Masood and Salem (2008).

Pro extrakci lipidů z biologického vzorku byla použita robustní a jednoduchá metoda dle Folcha (1957). Oproti jiným navrženým metodám (Senatore, 1988) je časově a materiálně nenáročná.

Lipidy extrahované z biologického vzorku jsme separovali pomocí SPE. Využili jsme metodu uvedenou v příloze 3, která byla vyzkoušena (kolonky, sorbent a postup) a modifikována Mgr. Janem Okrouhlíkem (ústní sdělení). Pomocí této metody dosahujeme v rámci frakce A a B velmi dobrých výsledků separace lipidů. K metodě není nutné složité vybavení a je obvyklou rutinní separační metodou.

V laboratoři existuje již zavedený postup transesterifikace (příloha 4), jehož spolehlivost byla ověřena laboratorní praxí. Návod byl sestaven na základě práce Heleny Zahradníčkové *et al.* K této metodě derivatizace není nutné speciální vybavení, není náročná na chemikálie a probíhá za laboratorní teploty na rozdíl od jiných složitějších metod (Causo, 1996; Massod and Salem, 2008), které přinášejí výsledky stejné kvality. Použitím transesterifikace v smyslu tvorby methylesterů mastných kyselin je jednou z nejběžnějších technik a je srovnatelná s jinými derivatizačními postupy (Sehat et al, 1998; Ulberth et al. 1999; Massod and Salem, 2008). V naší laboratoři vyvinutá transesterifikace je tedy velmi rychlá, opakovatelná a svou jednoduchostí převyšuje ostatní derivatizační techniky.

## 7. Závěr

Cílem této práce bylo zvládnout metodu GC /FID s nedílnou přípravou vzorku od samotné extrakce z biologického materiálu, rozdělení pomocí SPE a následné transesterifikace, poté byl vzorek připraven pro samotnou analýzu pomocí techniky GC/FID či GC/MS. Analýza provedená pomocí GC/FID je účinná a časově nenáročná i pro detekci vyšších mastných kyselin. Tato metodika podává nejen informace o zastoupení mastných kyselin, ale také umožňuje získání reálných koncentrací jednotlivých kyselin s využitím metody standardního přídatku. Technika GC/FID poskytuje komplementární data k hmotnostním spektrům získaným pomocí HPLC/MS. Zjištění retenčních časů i hmotnostních spekter výrazně zjednodušuje identifikaci složek vzorku. Pomocí této metodiky lze analyzovat celou řadu mastných kyselin ve velmi malém objemu tělní tekutiny nebo tkáně.

V zásadě se osvědčila metoda SPE pro nepolární lipidy a volné mastné kyseliny a také derivatizace methanolátem sodným. Metoda SPE umožňuje zpracování více vzorků najednou a velmi dobře oddělí molekuly cílových diglyceridů od pro náš účel odpadních fosfolipidů majících pouze funkci v transportním lipoproteinu. Derivatizace vzorku trvá přibližně 20 minut, probíhá za laboratorní teploty a využívají se při ní pouze běžně dostupné chemikálie.

Dalším cílem bylo vytvoření rešerše na téma energetického metabolismu s důrazem na mobilizaci lipidů. Do rešerše byl zahrnut i soubor informací o pokusném hmyzu ruměnici pospolné - *Pyrrhocoris apterus*.

## Literatura

- E. L. Arrese, Lilian E. Canavoso, Zeina E. Jouni, James E. Pennington, Kozo Tsuchida, Michael A Wells: Lipid storage and mobilization in insects: current status and future directions. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31, 7-17, 2001.
- E. L. Arrese, J. L. Soulages: Insect fat body: Energy, metabolism and regulation. *Annu. Rev. Entomol.*, 55, 207-25, 2010.
- A. M. Th. Beenackers, D. J. Van Der Horst and W. J. A. Van Marrewijk: Insect flight Muscle metabolism. *Insect Biochem.*, 14, 243-260, 1984.
- J. Berger, Slavičková K.: Morphological Characterization of Hemocytes in the Adult Linden Bug, *Pyrrhocoris apterus* (L.) (Heteroptera). *Zoological studies*, 47 (4), 466-472, 2008.
- L. E. Canavoso, Z. E. Jouni, K. J. Karnas, J. E. Pennington, and Michael A. Wells: Fat metabolism in insect. *Annual Review of Nutrition*, 21, 23-46, 2001.
- U. Causo: Simple analysis of plasmalogens in erythrocytes using gas chromatography/mass spectrometry with selected-ion monitoring acquisition. *Rapid communications in mass spectrometry*, 10, 1283-1285, 1996.
- J. Cvačka, Oldřich Hovorka, Pavel Jiroš, Jiří Kindl, Karel Stránský, Irena Valterová: Analysis of triacylglycerols in fat body of bumblebees by chromatographic methods. *Journal of Chromatography*, 1101, 226-237, 2006.
- J. Folch, Lees, M., Sloane Stanley, G.H: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497-509, 1957.
- G. Gade, P. Simek, K.D.Clark, L. Auerswald: Unique translation modification of an invertebrate neuropeptide: a phosphorylated member of adipokinetic hormone peptides family. *Biochemical Journal*, 393, 705-713. 2006.
- G. J. Goldsworthy, D. Kodrik, R. Comley, M. Lightfoot: A quantitative study of AKH of the firebug *Pyrrhocoris apterus*. *Journal of Insect Physiology*, 48, 1103-1109, 2002.
- R. G. H Downer: Functional role of lipids on insect. *Biochemistry of Insect. Biochemistry of Insect* 57-92, 1978.
- R.G.H Downer: Lipid metabolism, in: Kerkut, G.A., Gilbert, L.I. (Eds.), *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, Pergamon Press, Oxford, Vol. 10, 77-113, 1985.
- D. Kodrik, G. J. Goldsworthy: Inhibition of RNA synthesis by adipokinetic hormones and brain factor(s) in adult fat body of *Locusta migratoria*. *J. Insect Physiol.* 4, 127-133, 1995.



- D. Kodrík, R. Socha, P. Šimek, R. Zemek, G. J. Goldsworthy: A new member of the AKH/RPCH family that stimulates locomotory activity in the firebug, *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30, 489-498, 2000.
- D. Kodrík: Adipokinetic hormone functions that are not associated with insect flight. *Physiological entomology*, 33 (3), 171-180, 2008.
- V. Košťál, P. Šimek, Changes in fatty acid composition of phospholipids and triacylglycerols after cold-acclimation of an aestivating insect prepupa. *J. Comp. Physiol. B -Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 168, 453-460, 1998.
- J. S. Martin: Lipid composition of the fat body and its contribution to the maturing oocytes in *pyrrhocoris apterus*. *Insect Physiol.*, 15, 1025-1045, 1969.
- J. S. Martin: Studies on Assimilation, mobilization and transport of lipids by the fat body and haemolymph of *Pyrrhocoris apterus*. *Insect Physiol.*, 15, 2319-2344, 1969.
- M. A. Massod, N. Salem Jr.: High-throughput analysis of plasma fatty acid methyl ester employing robotic tranesterification and fast gas chromatography. *Lipids*, 43, 171-180. 2008.
- I. Schneedorferová: Analýza mastných kyselin v diglyceridech a triglyceridech tělních tekutin pomocí plynové chromatografie. 2009.
- F. Senatore: Chemical constituents of some species of Agaricaceae. *Biochemical Systematic and Ecology*, 16, 605-614. 1988.
- N. Setah, J. K. G. Kemaer, M. M. Mossoba, M. P. Yurawecz, J. A. G. Roach, K. Eulitz, K. M. Morehouse, Y. Ku: Identification of conjugated linoleic acid isomer in cheese by gas chromatography, silver ion high performance liquid chromatography and mass spectral reconstructed ion profiles. Comparison of Chromatographic elution sequences. *Lipids*, 33 (10), 963-971. 1998.
- R. Socha: *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera) – an experimental model species: A review. *Eur. J. Entomol.*, 90, 241-286, 1993.
- R. Socha, D. Kodrík: Differences in adipokinetic response of *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera) in relation to wing dimorphism and diapause. *Physiological Entomology*, 24, 278-284, 1999.
- R. Socha, D. Kodrík a R. Zemek: Stimulation of locomotion in *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera:Pyrrhocoridae) is wing-morph independent and correlated with lipid mobilization by adipokinetic hormone. *Eur. J. Entomol.*, 96, 459-461, 1999.

- A. Tomčala, Iva Bártů, Petr Šimek, Dalibor Kodrık: Locusts adipokinetic hormones mobilize diacylglycerols selectively. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 156, 26-32, 2010.
- S. F. Vroemen, W. J. A. Van Marrewijk, C. C. Schepers and D. J. Van Der Horst: Signal transduction of adipokinetic hormones involves  $Ca^{2+}$  fluxes and depends on extracellular  $Ca^{2+}$  to potentiate cAMP-induced activation of glykogen phosphorylase. *Cell Kalcium*, 17, 459-467, 1995.
- Franz Ulberth, Robert G. Gabernig, and Franz Schrammel: Flame-Ionization Detektor Response to Methyl, Ethyl, Propyl, and Butyl Ester of Fatty Acids. *JAOCS*, 76, 263-266, 1999.
- G. Zhao, Jing-fu Liu, M. Nyman, J. A. Jossen: Determination of short-chain fatty acid in serum by hollow fiber supported liquid membráně extraction coupled with gas chromatography. *Journal of Chromatography B*, 846, 202-208. 2007.

<http://en.wikipedia.org/wiki/Derivatization>

<http://en.wikipedia.org/wiki/Chromatography>

[http://en.wikipedia.org/wiki/Solid\\_phase\\_extraction](http://en.wikipedia.org/wiki/Solid_phase_extraction)

<http://en.wikipedia.org/wiki/Transesterification>

[http://en.wikipedia.org/wiki/Flame\\_ionization\\_detector](http://en.wikipedia.org/wiki/Flame_ionization_detector)

[http://tomcat.prf.jcu.cz/sima/analyticka\\_chemie/separb.htm](http://tomcat.prf.jcu.cz/sima/analyticka_chemie/separb.htm)

<http://ireferaty.lidovky.cz/300/5551/Rumenice-pospolna>

<http://www.naturabohemica.cz/pyrrhocoris-apterus/>

[http://cs.wikipedia.org/wiki/Ruměnice\\_pospolná](http://cs.wikipedia.org/wiki/Ruměnice_pospolná)

### Seznam použitých zkratk

ACoNH <sub>4</sub>	Octan amonný
AKH/s	Adipokinetický/é hormon/y
ApoLp	Apolipoprotein
ATGL	Adipose triglyceride lipase
cAMP	Cyklický adenosinmonofosfát
DAG/s	Diacylglycerol/y
DGLp	Lipoprotein přenášející diacylglyceroly
EtOH	Ethanol
FA/s	Mastná/é kyselina/y
FAME/s	Methylester/y mastných kyselin
FFA/s	Volná/é mastná/é kyselina/y
FID	Plamenový ionizační detektor
GC	Plynová chromatografie
GC/FID	Plynová chromatografie s plamenovým ionizačním detektorem
GLC	Plynová kapalinová chromatografie
GSC	Plynová adsorpční chromatografie
HCl	Kyselina chlorovodíková
HDLp	Lipophorin o vysoké hustotě
CHCl <sub>3</sub>	Chloroform
LC	Kapalinová chromatografie
LC/MS	Kapalinová chromatografie v kombinaci s hmotnostní detekcí
LDLp	Lipophorin o nízké hustotě
Lsd	Proteiny tukových kapének
MAGs	Monoacylglycerol/y
PC	Fosfatidilcholin
PE	Fosfatidilethanolamin
RPCH	Red pigment concentrating hormone
SM	Sfingomyelin
SPE	Extrakce na tuhou fázi
TAG/s	Triacylglycerol/y
TGL	Triglyceride lipase

## Přílohy

### Příloha 1: Použité chemikálie

Látka	Značka	Firma
Acetic Acid 100%	Suprapur	MERCK
n-Hexan	Suprasolv	MERCK
Metanol	Chromasolv	Seidel-deHaen
2-Propanol	LC-MS chromasolv	Seidel-deHaen
Diethylether	EC 200-467	ALDRICH
NH <sub>4</sub> AC 99,9%	-	MERCK
Chlorofom 99,8% stab. 1% etanolu	Chromasolv	SIGMA-ALDRICH
Čistý Na	-	-
Isooctan	-	MERCK
H <sub>2</sub> O destilovaná a neionizovaná	-	-

## **Příloha 2: Extrakce lipidů z biologického vzorku**

### **Extrakční medium:**

Chloroform : metanol - 2:1

Vzhledem k použití chloroformu je velmi důležité vyvarovat se kontaktu extrakčního média s jakýmkoliv plasty, proto pro samotnou homogenizaci a extrakci použijeme skleněné nádoby. Před samotnou extrakcí probubláme extrakční medium dusíkem, čímž odstraníme kyslík z média a zabráníme tak případné oxidaci lipidů.

### **Postup:**

- Vypreparovanou tkáň (cca 50mg) převedeme do skleněného homogenizátoru s 0,5 ml extrakčního média. Homogenizátor je neustále podchlazen v ledu.
- Provedeme homogenizaci tkáně (několika pohyby tloučku v homogenizátoru, záleží na povaze vypreparované tkáně).
- Centrifugujeme na 5000g po 10 minut při 4°C, posbíráme supernatant S1 (použijeme Hamiltonovy stříkačky)
- Rehomogenizujeme zbylý pelet s nově přidaným 0,5 ml extrakčním médiem
- Centrifugujeme na 5000g po 10 minut při 4°C, posbíráme supernatant S2.
- Spojíme supernatanty (S1+S2)
- K supernatantům přidáme 0,1M octan amonný (AcOHN<sub>4</sub>) a promícháme
- Centrifugujeme na 5000g po 10 minut při 4°C, posbíráme spodní organickou fázi obsahující lipidy
- Organickou část vysušíme v proudu dusíku a uskladníme do -80°C do doby analýzy

### **Příprava vzorku na analýzu:**

Vzorek rozpustíme v 0,5 ml CHCl<sub>3</sub> stabilizovaným EtOH

### **Příloha 3: SPE (solid phase extraction) lipidů**

#### **SPE kolonky:**

Pro naši potřebu se nejlépe osvědčili kolonky BondElut firmy Varian inc. s 500 mg sorbetu na bázi NH<sub>2</sub>

#### **Zařízení na SPE:**

Baker

#### **Vymývací roztoky:**

Solution A: Chloroform : 2-Propanol, poměr 2:1

Solution B: 2% kyselina octová rozpuštěná v diethyletheru

Solution C: Metanol

#### **Postup:**

- Kondicionování kolonky: nanese 4ml n-Hexanu, necháme prokapat dokud kolonka nezbělá (je suchá) a hned nanášíme vzorek.
- Nanese 100 $\mu$ l vzorku – vzorek musí být rozpuštěn v CHCl<sub>3</sub> ~ EtOH (nanášíme Hemiltonovou stříkačkou)
- Hned za vzorkem nanese 4 ml Solution A (skleněnou pipetou) a necháme prokapat
- Vypneme vacuum a vyměníme vialky na odběr jednotlivých frakcí a nalijeme Solution B. Poté opět zapojíme vakuum a necháme prokapat Solution B
- Opakujeme krok 4 se Solution C.

#### **Předpokládaný výsledek:**

Frakce A – 4ml – TAGs a DAGs

Frakce B – 4ml – Volné mastné kyseliny

Frakce C – 4ml – PEs a PCs

#### **Příprava vzorku pro derivatizaci:**

Všechny frakce pomocí vakuové odpařovačky speedvac odpaříme do sucha a rozpustíme ve 100  $\mu$ l CHCl<sub>3</sub> stabilizovaným EtOH

#### **Příloha 4: Příprava metylesterů mastných kyselin**

- 1 ml skleněná lahvička na derivatizaci
  - přidáme interní standard 50  $\mu$ l roztoku – 20 ng/ ml rozpuštěného v isooctanu
  - přidáme 50  $\mu$ l hexanu
  - přidáme 100  $\mu$ l 2 M metanolátu sodného (sodium methoxide) – připravíme tak, že rozpustíme 0,46g čistého Na v 10 ml sušeného metanolu
  - utěsníme derivatizační lahvičku silně protřepeme 10 vteřin a pak dalších 15 minut dáme na třepačku na slabší třepání
  - přidáme 100  $\mu$ l hexanu
  - přidáme 220  $\mu$ l (v případě PL) nebo 240  $\mu$ l HCl (1M, rozpuštěné ve vodě)
- protřepeme
- upravíme pH na 5
  - odebereme do lahvičky horní hexanovou vrstvu
  - opět přidáme 200  $\mu$ l hexanu
  - protřepeme a horní hexanovou vrstvu odebereme a přidáme ji k předchozí hexanové vrstvě
  - lahvičku s hexanovými fázemi odpaříme do sucha
  - přidáme 100  $\mu$ l isooctanu a dáme měřit (nutné vialky se spacerem)