

Prirodovedecka fakulta studijni oddeleni
Jihoceska Univerzita
Branisovska 31
370 05 Ceske Budejovice
CZECH Republic

Report on "The role of insect adipokinetic hormones in oxidative stress"

by RNDr. Josef Večeřa

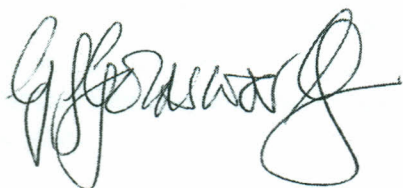
Although the title of this thesis suggests that adipokinetic hormones (AKHs) somehow induce oxidative stress (OS), the main thrust of all of the work is to promote the opposite viewpoint. This thesis comprises an introduction to 3 of 6 published papers bearing the candidate's name, followed by a brief set of conclusions. The research work undertaken by the candidate is therefore self-evidently of publication-standard. However, the introduction and brief final conclusions appended by the candidate to these papers are disappointing, and there is no discussion section. I expected to be presented with an in-depth final discussion of the physiological significance of these studies: a philosophical analysis of the role of insect adipokinetic hormones (and other insect hormones such as ecdysone and Juvenile Hormone) in (combating) oxidative stress. So, there is no final discussion, only a rather long introduction to the topic of OS and a then a superficial account of the involvement of AKHs, other hormones, and proposed hormones, as agents in antioxidative measures: this adds little to the various discussions contained in the included papers. I think the candidate needed to write a wider-ranging general discussion tying up the three main papers to elucidate and argue the major theme. This could have included an explanation of why the release of endogenous AKH (or glucagon-like material) under conditions of OS does not prevent the very changes that large doses of exogenous AKH (or mammalian glucagon) counteract. If the release of endogenous messengers is ineffective, perhaps the imposed OS is too extreme, or should the candidate question whether he is really looking at a physiologically meaningful phenomenon? Can the candidate offer suggestions for future work that could negate these questions? Can the candidate suggest approaches to demonstrate (perhaps in another insect?) that the changes he measures in response to OS are greater when the release of endogenous AKH is not possible or is prevented in some way? With reference to the mammalian glucagon studies I would like to have seen more discussion of the physiological evidence for and against the idea that endogenous neuropeptides that are glucagon-like in their antigenicity are having a true physiological role in insect systems: discussion about chemical identification and endogenous titres versus doses of exogenous peptides, for example.

The candidate writes in a relaxed and easy to read style, but is occasionally too chatty (in the final conclusions, for example), and the text is, with a few exceptions, generally well-referenced. However, the thesis (and the published papers) seem to not appreciate always the difference between physiology and pharmacology: the text reads frequently as if "roles" of endogenous AKHs and "actions" of exogenous (AKH) neuropeptides are synonymous. Indeed, on page 14 in the introduction (third paragraph) he writes rather amazingly about the "Role of exogenous AKH actions.....". In the introduction and the papers, the candidate and his colleagues write often that AKHs are typical insect stress hormones, but offer no evidence that AKHs are released by physical 'stressors': the few established stimuli for

release (under physiological conditions) are quite specific (such as flight), rather than the more general range of chemical 'stresses' studied in this research. I was also disappointed that the original papers showing massive and non-specific release of insect neurohormones (including diuretic hormone) due to insecticide poisoning are not cited (Maddrell and colleagues in the early 1970s), nor are the possible mechanisms (unrelated to OS) for this at the membrane level discussed.

The candidate is first author only on papers 1 and 4, and it would have been informative to know of his 'role' or contributions to papers 2, 3, 5 and 6 since he is not last author on these papers either. Paper 1 appears to be the most recent work of the candidate, and one of which he has most ownership, and I looked closely at this paper. Here, the candidate contends in the last paragraph of the introduction to the publication that *Spodoptera littoralis* is a highly convenient model for studies of OS because (apart from it being highly sensitive to OS) it has two identified AKHs which are readily available in synthetic form, but the study unexpectedly uses only Manse-AKH and no data are given for Helze-HrTH! In addition, the candidate does not explain why starved insects were used in the experiments: no data is included for non-starved insects with and without injection of AKH. We know from the work s of Professors Simpson and Bernays that insects can make very sophisticated dietary choices, so in 'the real world', insects could avoid OS induced by dietary components such as tannic acid simply by choosing another food source. Did the insects given the tannic acid diet eat as much diet as the controls? Are any quantitative differences in dietary intake likely to have been involved in any of the changes measured? Could the known and rather non-specific effect of AKHs in inhibiting protein synthesis explain the data on expression? Some discussion or denial of these propositions would have been welcome.

In conclusion, the thesis represents a body of research which has already been accepted for publication, and the candidate has benefited from a good training in a wide range of research methods as evidenced by the scope of his papers. Of course, my experience is of a different examination system, but I have always encouraged PhD candidates to take advantage of the 'once in a lifetime' opportunity to speculate and discuss at length, free from commercially imposed editorial constraints on length. I see this thesis as a missed opportunity in that regard. So, if this thesis fulfils the regulations and requirements of the University, I recommend the award of a PhD to RNDr. Josef Večeřa.



Professor G.J. Goldsworthy
20th January, 2012



Oponentský posudek na dizertační práci Josefa Večeři „The role of insect adipokinetic hormones in oxidative stress“

Předložená dizertační práce zpracovává problematiku oxidativního stresu u hmyzu a jeho ovlivnění adipokinetickým hormonem (AKH) nebo lépe řečeno neuropeptidy ze skupiny AKH. AKH je zapojen zejména v energetickém metabolismu hmyzu, zde je ale detailně studována jedna z vedlejších funkcí – jeho zapojení v antioxidačních obranných mechanismech. Oblast studia oxidativního stresu u hmyzu je velmi aktuální, protože řada používaných insekticidů způsobuje právě porušení rovnováhy pro- a antioxidačních mechanismů, což vede k oxidativnímu stresu. V dizertační práci je k indukcii oxidativního stresu používán herbicid paraquat a dva insekticidy (malathion a endosulfan) pro experimenty na *Pyrrhocoris apterus* a kyselina tříslová pro *Spodoptera littoralis*. Změny AKH byly sledovány v centrální nervové soustavě a v hemolymfě modelových organismů. Výsledky prokazují zapojení AKH v aktivaci antioxidačních obranných mechanismů a naznačují možnou dráhu aktivace. Experimenty probíhaly na pracovišti dlouhodobě specializovaném na AKH a vysoce hodnotím i zapojení externího školitele z USA.

Dizertační práce je vypracována formou anglického úvodu na 30 stranách a dále ji tvoří tři hlavní (z toho jeden prvoautorský) a tři vedlejší články (z toho jeden prvoautorský použitý pro obhájení rigorózní práce) z odborných časopisů. Na závěr práce jsou shrnuty výsledky z publikací na 2 stranách. V úvodu jsou popsány reaktivní kyslíkové metabolity včetně jejich tvorby a přeměny, dále oxidativní stres, jeho indukce a projevy. Obsáhle jsou popsány neuropeptidy ze skupiny AKH, jejich receptory a také další hormony účastníci se oxidativního stresu. Úvodní část je zpracována na základě 140 literárních zdrojů, další zdroje jsou citované v jednotlivých publikovaných článcích. V dizertační práci je řada originálních výsledků, o jejich kvalitě svědčí také to, že publikované články již prošly recenzním řízením v kvalitních zahraničních časopisech (Comparative Biochemistry and Physiology, Part C, IF=2,3; General and Comparative Endocrinology, IF=3,1; Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, IF= 2,0; Archives of Insect Biochemistry and Physiology, IF=1,6; Insect Science, IF=1,0). Po formální stránce tato práce plně odpovídá standardům kladeným na doktorskou dizertační práci, metodiky jsou v publikacích dostatečně popsány, výsledky zřetelně prezentované a dokumentované originálními grafy a obrázky, text je velmi přehledný a srozumitelný.

K předkládané práci nemám zásadní námítky, následně uvádím jen drobné připomínky a několik dotazů:

- Úvodní část by měla obsahovat více obrázků, např. schéma znázorňující tvorbu a přeměnu reaktivních metabolitů kyslíku a zapojených antioxidačních enzymů, aby se čtenář nepracující v dané problematice lépe zorientoval. Kromě jednoho obrázku v úvodu jsou výsledky uvedeny pouze v publikovaných článcích, kde je někdy rozlišení např. elektroforetogramů a čitelnost malých popisů po několikanásobném kopírování ztížena (např. str. 75-77 v mém výtisku dizertační práce).





- Reaktivní metabolity kyslíku se účastní u savců tzv. oxidativního vzplanutí, je analogický proces známý i u některých skupin bezobratlých? Jsou rozdíly v produkci radikálů a oxidativním stresu mezi jednotlivými skupinami (nebo dokonce druhy) hmyzu nebo se jedná o reakce společné všem?
- Herbivorní hmyz přijímá velké množství antioxidantů s potravou, je celková aktivita pro- a antioxidačního systému (případně riziko oxidačního stresu) vyšší u herbivorů než u hmyzu s jiným typem výživy? Jak se liší v rámci jednoho druhu hmyzu larvy a dospělci v náchylnosti k oxidativnímu stresu?
- Jak jsou látky indukující oxidativní stres použité v této dizertační práci specifické pro hmyz, tj. působí podobným mechanismem i na jiné půdní bezobratlé živočichy?
- Podle mého názoru by bylo užitečné zapojit do experimentů octomilku *Drosophila melanogaster*, která se již pro studium oxidativního stresu používá (indukce také pomocí herbicidu paraquat), navíc je možná genetická manipulace s možností použít mutanty nebo RNAi linie.

Dizertační práce Josefa Večeří představuje rozsáhlou a metodicky i časově náročnou studii. Autor v ní dále dokazuje, že má velký přehled o literárních údajích a dovede své výsledky s těmito údaji srovnávat, kriticky je hodnotit a diskutovat. Předkládaná práce jednoznačně splňuje požadavky kladené na tento typ práce, proto ji **doporučuji ke schválení** jako jeden z předpokladů k udělení titulu Ph.D.

V Brně 23.1.2012

RNDr. Pavel Hyršl, Ph.D.

tel.: +420 532 146 211

e-mail: hyrsl@mail.muni.cz



Oponentský posudek

Disertační práce **RNDr. Josefa Večeři** má název „**The role of insect adipokinetic hormones in oxidative stress**“ a shrnuje výsledky získané při studiu úlohy adipokinetického hormonu v rozvoji oxidačního stresu u hmyzu. Byla vypracována v Laboratoři fyziologie hmyzu Entomologického ústavu Biologického centra AV ČR v Českých Budějovicích pod vedením školitele Prof. RNDr. Dalibora Kodríka, CSc.

Vlastní práce je sepsána v angličtině. Práce sestává z obecného úvodu (18 stran), následovaného seznamem použité literatury. Vlastní výsledky práce jsou prezentovány formou přiložených kopií 6 článků, opublikovaných (nebo přijatých k publikaci) v recenzovaných vědeckých časopisech. Na konci práce jsou stručně shrnuty závěry ze tří zásadních publikací, bezprostředně se týkajících zadaného tématu disertační práce.

V úvodu práce disertant stručně popisuje tvorbu a funkci jednotlivých reaktivních metabolitů kyslíku a jejich úlohu ve vzniku a rozvoji oxidačního stresu. Dále se zabývá experimentálními modely indukce oxidačního stresu u hmyzu a shrnuje dosavadní znalosti o regulaci oxidačního stresu u hmyzu látkami ze skupiny adipokinetických hormonů. Na závěr stručně shrnuje i úlohu ostatních hmyzích hormonů v oxidativním stresu.

Z předložených publikací je zřejmé, že se disertant aktivně zúčastňoval výzkumných prací v oblasti hodnocení úlohy adipokinetického hormonu na modelu oxidačního stresu u druhu *Pyrrhocoris apterus*, vyvolaného různými herbicidy (paraquat) nebo insekticidy (malathion, endosulfan). Disertantův příspěvek spočíval především v optimalizaci metodik a ve stanovení vybraných antioxidantů a markerů oxidačního poškození biologicky důležitých makromolekul.

Největším přínosem předkládané práce je studium účinků adipokinetického hormonu na rozvoj oxidačního stresu ve střevní tkáni posledního larválního instaru motýla *Spodoptera littoralis*, indukovaného kyselinou tanovou. Výsledky práce potvrzují hypotézu, že adipokinetický hormon příznivě působí na snižování důsledků oxidačního stresu v daném modelu. To autor dokládá na jedné straně zjištěným snížením hladiny karbonylovaných proteinů (markeru oxidačního poškození), na druhé straně zvýšenou aktivitou glutathion-S-transferasy, enzymu s antioxidační aktivitou. Zatímco exprese mRNA pro katalasu a superoxid dismutasu byla po aplikaci adipokinetického hormonu snížena na úroveň kontroly, jejich aktivita zůstala nezměněna. Aplikace adipokinetického hormonu neměla žádný vliv na hladinu redukováného glutathionu.

Studovaná problematika je vysoce aktuální a získané výsledky přispívající k obecným znalostem v daném oboru. Autor prokázal schopnost samostatné tvůrčí činnosti ve výzkumné oblasti a výbornou orientaci ve studované problematice, což dokládá výčet 140 (vesměs současných) citací použité literatury. Autor úspěšně zvládl a optimalizoval různé metodiky stanovení rozsahu oxidačního stresu. Hodnotu práce ilustruje, že výsledky byly opublikovány v recenzovaných odborných časopisech.

K práci mám následující připomínky a dotazy:

1. Za zásadní formální nedostatek předkládané práce pokládám to, že v práci úplně chybí specifikace jednotlivých vytčených cílů práce.
2. V úvodu autor uvádí, že peroxid vodíku je silnějším oxidantem než superoxidový radikál. Je tomu skutečně tak?
3. Jako modelový systém byla v práci zvolena indukce oxidačního stresu kyselinou tanovou. Ta je přitom považována (spolu s ostatními příbuznými polyfenolickými látkami) za látku se silnými antioxidačními účinky, dokonce s různým způsobem účinku. Mohl by autor zvolený model podrobněji popsat a komentovat?
4. Má autor nějakou představu o případných přímých antioxidačních (vychytávacích) účincích adipokinetického hormonu?
5. Jaká je produkce adipokinetického hormonu u larev druhu *Spodoptera littoralis*? Jaká byla bazální hladina adipokinetického hormonu u kontrolních jedinců a byla hladina uvedeného hormonu změněna po aplikaci použitého stresoru – kyseliny tanové?

Závěrem konstatuji, že výše uvedené připomínky nikterak nesnižují kvalitu a hodnotu předkládané práce. Disertační práce RNDr. Josefa Večeři splňuje požadavky standardně kladené na disertační práci v daném oboru a doporučuji, aby byla na základě §47 Zákona o vysokých školách č.111/98 přijata k obhajobě.

V Brně 23. 1. 2012



RNDr. Milan Číž, Ph.D.

Biofyzikální ústav AV ČR