

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyziologie živočichů



Diplomová práce

Chladová odolnost hmyzu a sezónní změny ve složení sterolů a tokoferolů

Insect cold tolerance and seasonal changes in composition of sterols and tocopherols



Autor práce: Bc. Tomáš Urban

2012

Vedoucí práce: Doc. Ing. Vladimír Košťál, Csc.

Úvodní obrázek: Autor MUDr. Pavel Schlemmer ©

Urban, T. (2012): Chladová odolnost hmyzu a sezónní změny ve složení sterolů a tokoferolů, [Insect cold tolerance and seasonal changes in composition of sterols and tocopherols], Mgr. Thetis, in Czech, Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, -49- p.

Anotace a klíčová slova

Předkládaná práce se zabývala zkoumáním chladové odolnosti u hmyzu (*Pyrrhocoris apterus*), zvláště pak kvalitativním a kvantitativním složením a sezónními změnami v obsahu sterolů a tokoferolů v membránách. To zahrnovalo sběr jedinců, extrakci tkání, separaci, přípravu vzorků a jejich analýzu. Podařilo se detekovat tři různé steroly (živočišný cholesterol, rostlinný kampesterol a sitosterol). Dále byly zjištěny izomery δ -tokoferolu a γ -tokoferolu. Obsah cholesterolu byl v rozmezí 0,2 - 0,8 molárních %, u fytosterolů bylo rozmezí 1,2 – 15,2 molárních % a u tokoferolů bylo rozmezí 0,1 – 31,3 molárních %. Nakonec bylo vyhodnoceno sezónní kolísání sterolů a tokoferolů s minimem v létě a s maximem v zimě.

[*Pyrrhocoris apterus*, chladová odolnost, steroly, tokoly, membrány]

Annotation and key words

Presented work focused on researching cold resistance in insects (*Pyrrhocoris apterus*), especially in qualitative and quantitative composition and seasonal changes in the content of tocopherols and sterols in membranes. Collection of samples, tissue extraction, separation, sample preparation and the final analysis was included. There were detected three different sterols (animal cholesterol, plant sterols: campesterol and sitosterol). Also were detected δ -tocopherol and γ -tocopherol. Volume of cholesterol was in the range of 0.2 to 0.8 mol%, for phytosterols was the range from 1.2 to 15.2 mol%, and for tocopherols was the range from 0.1 to 31.3 mol%. Seasonal fluctuations of sterols and tocopherols were evaluated with a minimum in summer and maximum in winter.

[*Pyrrhocoris apterus*, cold resistance, sterols, tocols, membranes]

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „Chladová odolnost hmyzu a sezónní změny ve složení sterolů a tokoferolů“ vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Dále prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 12. 12. 2012

.....

Poděkování

Zde bych chtěl poděkovat všem, kdo mi pomohli s uskutečněním mé diplomové práce, jmenovitě pak svému školiteli Vladimíru Košťálovi za obrovskou pomoc, příkladnou inspiraci, věcné rady a v neposlední řadě za velice dobrou spolupráci. Děkuji také Lucii Řimnáčové za pomoc s analýzami.

Dále pak děkuji oddělení analytické biochemie Entomologického ústavu Biologického centra v Českých Budějovicích a zaměstnancům tohoto oddělení za umožnění změření vzorků.

Nechci opomenout poděkovat i své rodině a kamarádům a nejbližším za zázemí, při kterém jsem mohl tuto práci vytvořit.

OBSAH

1. Úvod	- 6 -
2. Teoretická část	- 8 -
2.1 Chladové adaptace u hmyzu.....	- 8 -
2.2 Sezónní restrukturační biologických membrán	- 9 -
2.2.1 Fyzikální vlastnosti membrán	- 11 -
2.2.2 Vliv komponentů membrány na její fyzikální vlastnosti	- 12 -
2.2.3 Steroly	- 15 -
2.2.3.1 Syntéza, absorpce a transport sterolů u hmyzu	- 15 -
2.2.3.2 Struktura a popis sterolů.....	- 17 -
2.2.3.2.1 Rostlinné steroly.....	- 17 -
2.2.3.2.2 Cholesterol	- 18 -
2.2.3.3 Prekurzory hormonů a vitamínů.....	- 19 -
2.2.3.4 Steroly v membránách.....	- 20 -
2.2.4 Tokoly	- 22 -
2.2.4.1 Názvosloví a struktura vitamínu E	- 22 -
2.2.4.2 Antioxidační funkce tokolů.....	- 23 -
2.2.4.3 Strukturní funkce tokolů.....	- 24 -
2.3 Ruměnice pospolná (<i>Pyrrhocoris apterus</i>)	- 26 -
2.3.1 Sezónní adaptace ruměnice pospolné.....	- 27 -
3. Cíle práce	- 29 -
4. Praktická část	- 30 -
4.1 Metodika	- 30 -
4.1.1 Sběr pokusných jedinců	- 30 -
4.1.2 Extrakce lipidů (Folchova metoda)	- 31 -
4.1.1 SPE frakcionace	- 32 -
4.1.2 Kvantifikace celkových fosfolipidů	- 34 -
4.1.3 Analýza sterolů, tokoferolů a fosfolipidů v BCLAB	- 34 -
4.1.4 Zpracování dat a statistické analýzy	- 35 -
5. Výsledky	- 36 -
6. Diskuze	- 39 -
7. Závěr	- 41 -
8. Literatura	- 42 -
9. Seznam použitých zkratk	- 49 -

1. Úvod

Země obíháním okolo Slunce a otáčením okolo své osy vytváří měnící se podmínky, ke kterým se musejí všichni živočichové přizpůsobovat. Ektotermové a tedy i hmyz mají v temperátních oblastech problém vyrovnat se se zimou. Z toho důvodu si museli vyvinout několik způsobů komplexních adaptací na přezimování. Tyto adaptace obsahují mnoho aspektů, jak ekologických (kam patří třeba výběr stanoviště, migrace, typ a množství potravy, konkrétní průběh počasí, biotické interakce), tak aspektů vývojových (např. ontogenetické stádium, dormance či aktivita). V neposlední řadě tyto adaptace obsahují aspekty fyziologické a biochemické.

Do těchto hledisek také patří, jakým způsobem se vyrovnává organismus se sníženými teplotami, ať už formou podchlazení nebo tolerancí ke zmrznutí. Dále pak zde hraje roli stupeň dehydratace organismu, zvýšená osmolalita, aktivizace opravných systémů a akumulace nízkomolekulárních látek s kryoprotektivním účinkem nebo akumulace látek jako jsou AFPs a antioxidanty. Důležitou úlohu zde hraje také restrukturační membrán.

Buněčné membrány jsou převážně tvořeny dvouvrstvou fosfolipidů a obsahují také proteiny, glykolipidy, glykoproteiny a jiné komponenty. Všechny složky hrají svou roli a mění své složení v rozdílných podmínkách, aby membrána správně fungovala. Právě i k tomu slouží steroly a zřejmě i tokoferoly.

Steroly jsou běžnou součástí buněčných membrán živočichů, rostlin i hub. Nejrozšířenějším zástupcem je cholesterol. Kromě jejich regulačních a metabolických rolí ve formě prekurzorů pro důležité steroidní hormony a vitamíny rozpustné v tucích, signálních molekul a regulátorů vývojových procesů, jsou právě strukturotvorné role sterolů v biologických membránách jejich nejdůležitějším úkolem (**Behmer and Nes, 2003**).

Tokoferoly jsou známy především díky své funkci antioxidantů, ale zároveň jsou významnou strukturní součástí biologických membrán. Tokoferoly v membránách zřejmě významně ovlivňují schopnost membrány tvořit zakřivené struktury (například mikrokly) anebo naopak kompenzovat laterální tlaky v lipidické dvojvrstvě, které mohou vznikat při zvýšení obsahu některých jiných lipidických (typicky lysofosfolipidů); (**Atkinson et al., 2008**).

Protože na téma „Chladová odolnost hmyzu a sezónní změny ve složení sterolů a tokoferolů“ existuje jen málo publikovaných informací, rozhodli jsme se pokusit se zjistit o tomto problému více.

2. Teoretická část

2.1 Chladové adaptace u hmyzu

Adaptační mechanismy typicky vytváří komplexní celky změn a událostí. Ektotermní organismy, a tedy i hmyz, podstupují vlivem zkracování délky dne a následně vlivem sezónního poklesu teplot v temperátních oblastech řadu adaptačních změn. Obvykle absolvují nižší teploty již ve stádiu dormance - kviescence nebo diapauzy. V posledních několika desetiletích se výzkum této životní strategie intenzivně rozvíjí, a to nejen u hmyzu. Jde o vývojový režim, jehož základním významem je překonání období nepříznivých podmínek pro život a rovněž synchronizuje významné životní aktivity jedince v rámci populace. Na rozdíl od kviescence, která je závislá přímo na faktorech prostředí, dostavuje se v jakékoliv fázi vývoje živočicha a mizí ihned po návratu příznivých podmínek, je diapauza vyvolána již před nástupem nepříznivých podmínek. Je indukována působením signálů z prostředí, nejčastěji změnami fotoperiody v kombinaci s teplotou. Navíc neodeznívá ihned po návratu příznivých podmínek a někdy je potřeba specifického signálu nebo lze jejího ukončení dosáhnout uměle (**Danks, 1987**).

Diapauza se dělí na obligátní a fakultativní. První z nich má vývoj fixovaný, geneticky naprogramovaný, nezávislý na vnějších podmínkách. Fakultativní diapauza je vyvolána specifickými vnějšími podněty a je alternativní cestou vývoje (**Danks, 1987**).

Ontogenezi zahrnující stádium diapauzy lze rozdělit do tří fází: (a) pre-diapauza (indukční a přípravná fáze), (b) diapauza (iniciační, udržovací a terminační fáze) a (c) post-diapauza (kviescence). Během indukční fáze jsou jedincem vnímány okolní podněty – signály z prostředí. Pokud dosáhnou kritické úrovně, rozhodnou o zařazení diapauzy do vývojového programu. Během přípravné fáze pokračuje přímý vývoj, ale informace o diapauze jsou již uloženy ve vývojovém programu a mohou se později uskutečnit. Začátkem diapauzy se zastavuje přímý vývoj. V iniciační fázi rychlost metabolismu rychle klesá a diapauzní intenzita je na maximu či může ještě stoupat. Udržovací fáze je charakterizována přetrváváním v diapauzním stavu, navzdory tomu, že většina abiotických i biotických faktorů je stále ještě příznivá pro přímý vývoj. V průběhu terminační fáze, obvykle spojené se změnou abiotických podmínek (například s nástupem nízkých teplot v zimě) se spouští sekvence dosud málo známých procesů, které vedou k postupnému snižování intenzity diapauzy až k jejímu ukončení diapauzy. Konec zimní diapauzy je typicky dosažen v období po zimním slunovratu a

souvisí s plným návratem vývojového potenciálu (**Košťál, 2006**). Tento vývojový potenciál je buď okamžitě realizován (jsou-li vnější podmínky příznivé pro další vývoj) anebo častěji, je realizován mnohem později, až po fázi post-diapauzní kviescence (například po jarním oteplení).

Dalším komplexem adaptivních změn, jež často provází zimní diapauzu hmyzu, je zvýšení chladové odolnosti. Z tohoto hlediska se hmyz dělí do dvou hlavních skupin. První skupinou je hmyz netolerující zmrznutí vody v těle (chill tolerant a freeze-avoiding) a druhou skupinou je hmyz odolný vůči zamrznutí vody (freeze-tolerant), ovšem jen v mezibuněčných prostorách (**Lee and Denlinger, 1991**).

Vysoké chladové odolnosti lze docílit pomocí komplexní změny mnoha různých fyziologických a biochemických faktorů. Snížením bodu podchlazení (SCP) pomocí inaktivace heterogenních nukleátorů ledu (freeze-avoidance). Nebo naopak, paradoxně, zvýšením SCP pomocí aktivací specifických nukleátorů ledu (freeze-tolerance). Dalšími součástmi adaptivního komplexu bývají: mírná či silnější dehydratace, zvýšení osmolality tělních roztoků, akumulace nízkomolekulárních látek s kryoprotektivním účinkem typu cukrů, polyolů, aminokyselin, aktivace obranných, reparačních a antioxidačních systémů, akumulace specifických anti-freeze proteinů (AFPs), a také komplexní restrukturační změny složení biologických membrán (**Lee and Denlinger, 1991**).

2.2 Sezónní restrukturační změny biologických membrán

Biologické membrány jsou tvořeny převážně dvojvrstvou fosfolipidů (Fig. 1), kde jsou hydrofilní části orientovány ven a hydrofóbní části fosfolipidů dovnitř membrány. Součástí této dvojvrstvy jsou proteiny, které slouží zejména jako receptory, membránové kanály, transportéry a některé z nich mají i enzymatickou aktivitu (**Spector and Yorek, 1985**).

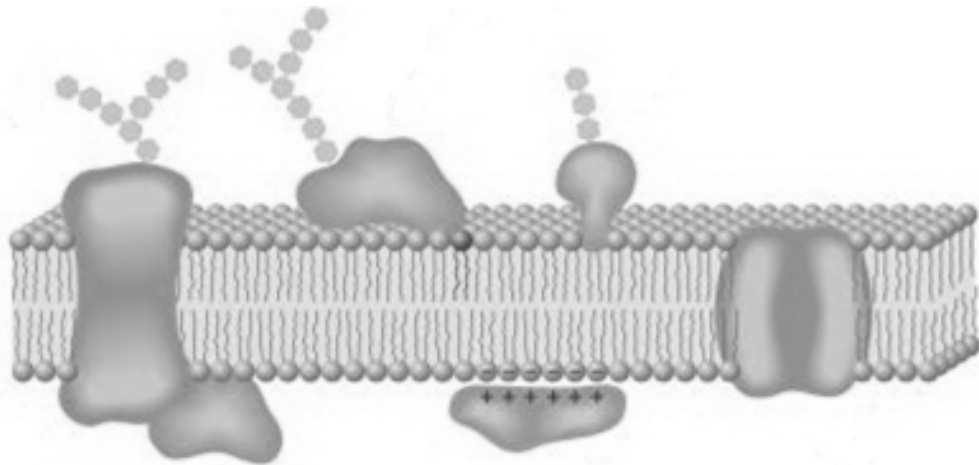


Fig. 1: Stavba biologické membrány (Kodíček, 2004).

Membrány hrají důležitou roli v buněčné fyziologii. Tvoří bariéru pro neregulovanou difúzi, zprostředkovávají regulovaný transport a mají mnoho dalších funkcí. Každá membrána může obsahovat lipidové domény, jejichž složení není stejné jako u jiných oblastí membrány. Složení membrán je pod přísnou buněčnou kontrolou (**Edidin, 2003**). Makroskopické domény jsou oblasti membrán, které jsou odděleny od jiných oblastí nějakou formou bariéry. Mikrodomény mohou vzniknout díky lokální separaci lipidů nebo náboje. Jejich vzniku lze také dosáhnout díky nekompatibilní délce řetězce, změně teploty, iontové síle nebo díky přítomnosti dvojmocných kationtů jako třeba Ca^{2+} (**Atkinson et al., 2008**).

Rozdílnosti v molekulárním tvaru, náboji a valstnostech jednotlivých forem lipidů vedou k rozdílné stavbě a funkci membrán. Při zkoumání forem lipidů jde o úvahy nad molekulárními tvary, zejména pak úvahy nad rozdílnými velikostmi hydrofilních hlavových skupin a hydrofobních skupin a díky tomu usnadňování včleňování lipidů do membránové dvojvrstvy. Obrázek 2 (Fig. 2) ukazuje 3 různé lipidy.

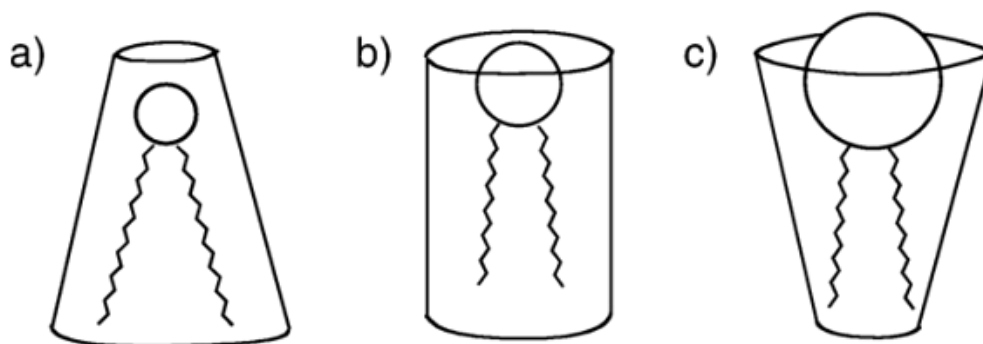


Fig. 2: Prostorové znázornění tvarů různých lipidů (Atkinson et al., 2008).

V případě fosfolipidů kruhy znázorňují obvyklé polární hlavové skupiny (etanolamin, cholin, serin atd.) a kužele či válce představují celkový tvar lipidové molekuly. Tyto modely mohou představovat jak neutrální lipidy jako je cholesterol nebo tokoferol, kde kruh představuje polární sekundární alkohol nebo fenol a kužel odráží celkový tvar molekuly (Atkinson et al., 2008).

2.2.1 Fyzikální vlastnosti membrán

Je již dlouho známo, že buněčná membrána je silně náchylná k poškození vlivem chladu. Toto poškození je manifestováno průnikem intracelulárních iontů a jiných rozpustných látek po jejich koncentračních gradientech přes membránu. Tento průnik je způsoben nejčastěji teplotním fázovým přechodem důležitých lipidů během zchlazení (Drobnis et al., 1993). Aby se tomuto typu poškození membrána vyhnula, musí měnit své složení a tedy i fyzikální vlastnosti.

Fyzikální vlastnosti lipidové dvojvrstvy jsou charakterizovány zejména jejím fázovým stavem a dále mírou uspořádanosti (order), která je častěji vyjadřovaná recipročně jako míra tekutosti (fluidita, dále bude užíván tento termín). Obě tyto fyzikální vlastnosti silně ovlivňují základní funkční vlastnosti všech membrán, tedy difúzní i regulovanou permeabilitu pro ionty, malé i větší molekuly a také enzymatickou aktivitu v membráně integrovaných proteinů.

Membránové lipidy se mohou nacházet v jednom ze tří základních fázových stavů: (a) vysoce uspořádané dvojvrstvě formované lipidy v lamelární gelové fázi (L_{β}), (b) fluidní dvojvrstvě, tzv. tekutě-krystalinní fázi (L_{α}) a (c) nedvojvrstvě, tzv. hexagonální fázi (H_{II}); (Chapman, 1975). Při nízkých teplotách se membránové lipidy navzájem přibližují a přechází do gelové fáze. Molekulární pohyby a difúze jsou velmi pomalé. Jakmile teplota dostatečně stoupne, dojde k teplotnímu fázovému přechodu (T_m), ve kterém gelová fáze přejde na formu tekutě-krystalinní fáze, kde je tloušťka dvojvrstvy redukována a jednotlivé molekuly fosfolipidů jsou navzájem dále od sebe. Další zvyšování teploty může v určitém bodu dosáhnout teploty (T_h) a zapříčinit tak přechod na nedvojvrstvý stav, hexagonální fázi, kdy membrána ztrácí svou celistvost. Když jsou membrány složeny z mnoha rozdílných lipidů, fázový přechod může mít široké teplotní rozmezí (Dowhan, 1997). Přechod z fluidní na gelovou fázi drasticky redukuje aktivitu enzymů a transportních systémů vázaných na membránu. Permeabilita membrány, ať už pasivní difúze nebo zprostředkovaný transport pomocí kanálů a pump

vedoucí k přenosu celé škály molekul, jsou také přímo ovlivněny fluiditou dvojvrstvy (**Hazel, 1995**).

Všechny fyzikální vlastnosti membrány jsou velmi silně ovlivněny nejen teplotou, ale i tlakem, stupněm hydratace a chemickým složením. Jelikož tlak a okolní teplota jsou faktory, které jedinec neovlivní, nemá jinou možnost než změnou stupně hydratace a hlavně změnami v chemickém složení membrán zajišťovat jejich správné fungování (**Tomčala et al., 2006**). Tyto změny pomáhají zvládat fyziologické funkce membrány u organismů žijících aktivním způsobem života, které tak kompenzují nižší teplotu okolí, nebo napomáhají zabránit v poškození membrán u jedinců obcházejících nízké teploty vstupem do stádia dormance (**Košťál et al., 2003; Murata, 1994; Shreve et al., 2004**).

Kompenzační adaptace vysvětluje několik paradigmat. Nejvýznamnější z nich, teorie homeoviskózní adaptace (HVA), uvádí, že aklimační změny, popřípadě evoluční rozdíly, pozorované ve fosfolipidickém složení biologických membrán různých živočichů jsou adaptivní a vedou k udržení konstantní fluidity membrány, jež je požadována pro optimální fungování integrovaných proteinů. Protože však všechna pozorování nezapadala do paradigmatu HVA, bylo postupně navrženo, že i další vlastnosti membrány, jako je fázový stav, dynamika fázových přechodů, nebo míra oxidativního poškození jsou významné pro pochopení funkčního významu změn v lipidickém složení membrán (**Sinensky, 1974**).

2.2.2 Vliv komponentů membrány na její fyzikální vlastnosti

Jako reakce ektotermních organismů na nízké teploty bylo pozorováno několik modifikací ve složení lipidů v membráně (Fig. 3): (a) desaturace (zvýhodňování proporcí nenasycených mastných kyselin na úkor nasycených mastných kyselin v glycerofosfolipidové (GPLs) membráně), (b) zkracování průměru délky řetězce mastných kyselin, (c) přeskupování mastných kyselin bez změn relativních proporcí individuálních mastných kyselin, (d) restrukturační polární hlavové skupiny (zvyšování relativních proporcí glycerofosfoetanolaminů (GPEtns)) a (e) změny GPL/cholesterolového poměru (**Hazel, 1995; Denlinger and Lee, 2010; Bennett et al., 1997**).

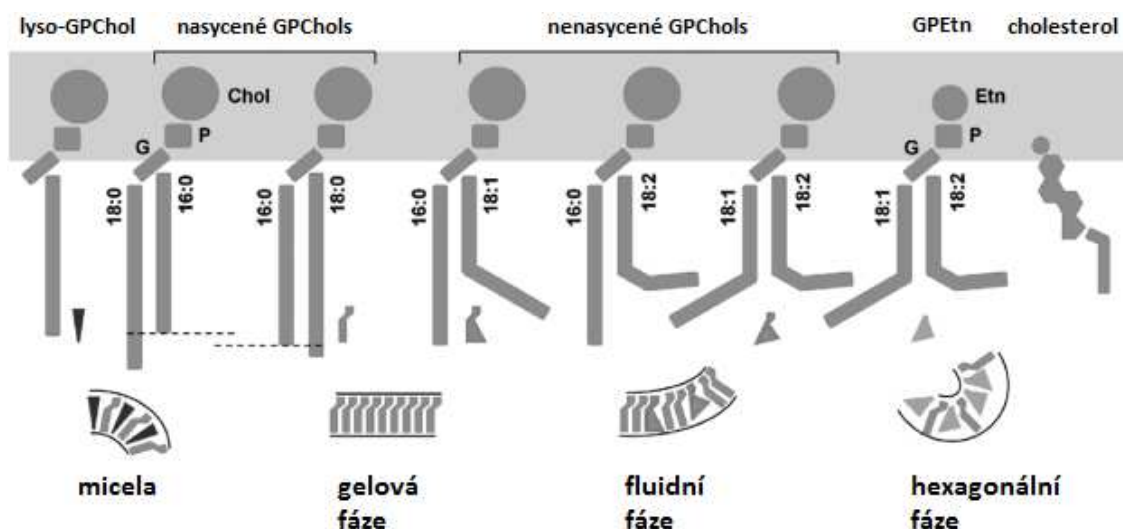


Fig. 3: Schéma modifikací lipidů v membráně (Denlinger and Lee, 2010).

K pochopení chování membrán je třeba se více zaměřit na její stavbu a stavbu jejích komponentů. Zavedení *cis* dvojně vazby do řetězce mastných kyselin vede k ohnutí řetězce mastné kyseliny o 30°. Nenasycené mastné kyseliny mají tendenci zabírat větší prostor a zvyšují tak kuželovitý charakter GPL molekuly, která se méně efektivně zapojuje do dvojvrstvy. Tím je výrazně snížena teplota fázového přechodu (T_m) z tekuté-krytalinní do gelové fáze a zároveň se zvyšuje fluidita membrány. Díky větší ploše hydrofobních interakcí, GPLs molekuly obsahující dlouhé řetězce mastných kyselin mají vyšší teplotu tání než ty s krátkými řetězci (**Huang et al., 1997**). Regulace délky řetězce mastných kyselin tak poskytuje další potenciální strategii pro kontrolu fluidity membrány. Zkracování řetězců mastných kyselin v odpovědi na snižující se teploty potvrzují pozorování u bakterií, kvasinek a rostlin. Zkracováním řetězců mastných kyselin tedy klesá teplota fázového přechodu (T_m) a fluidita membrány se opět zvyšuje (**Harwood et al., 1994**). Velikost hlavové hydrofilní části glycerofosfoetanolaminů (GPEtns) je menší než velikost této části u glycerofosfatidilcholinů (GPC). Navíc GPCs inklinují k vyšší hydrataci a jako následek jsou GPEtns více kuželovité než GPCs. Tento tvar GPEtns molekul je ještě výraznější, obsahuje-li nenasycené mastné kyseliny. Zvyšování proporcí takových molekul vede ke snížení teploty fázového přechodu (T_m) a ke zvýšení fluidity membrány. Velký nárůst GPEtns společně se snižováním míry hydratace ale může vést až k přechodu do hexagonální (H_{II}) fáze (**Kirk et al., 1984**). Dvě pozice sn-1 a sn-2 na glycerolu, kam se pojí mastné kyseliny esterifikované GPL molekulou, nejsou rovnocenné. Pokud se

připojí dvě stejné mastné kyseliny, ta na pozici sn-1 se zanoří hlouběji do dvojvrstvy. Když se připojí dvě rozdílné mastné kyseliny, pozice kratšího řetězce na pozici sn-2 snižuje teplotu fázového přechodu z tekuté-kryštalinné na gelovou fázi (T_m) a naopak (Wang et al., 1999). Podle stavu fáze membrány se mění i dopad cholesterolu na její strukturu. Tekuté-kryštalinná membrána se při zvyšování obsahu cholesterolu stane méně fluidní a v tomto důsledku její permeabilita a aktivita membránově vázaných enzymů klesají. Na druhou stranu kuželovitý tvar molekuly cholesterolu rozrušuje skládání GPLs v gelové fázi a tím je snížena teplota fázového přechodu (T_m). (Crockett and Hazel, 1995).

Stabilní dvojvrstva se může snadno skládat z molekul ve tvaru válců, jako jsou třeba glycerofosfocholiny. Jiné lipidy (např. glycerofosfoetanolaminy) jsou méně schopné se skládat do lipidické dvojvrstvy a výsledkem je potom méně stabilní dvojvrstva. V případě, kdy ve vzorku dominují nelamelární lipidy, jsou možné jiné tvary dvojvrstvy (Fig. 4, Fig. 5). Jde o fázi kubickou (Fig. 5a) a hexagonální (Fig. 5b); (Caffrey, 2003; Lee, 2004).

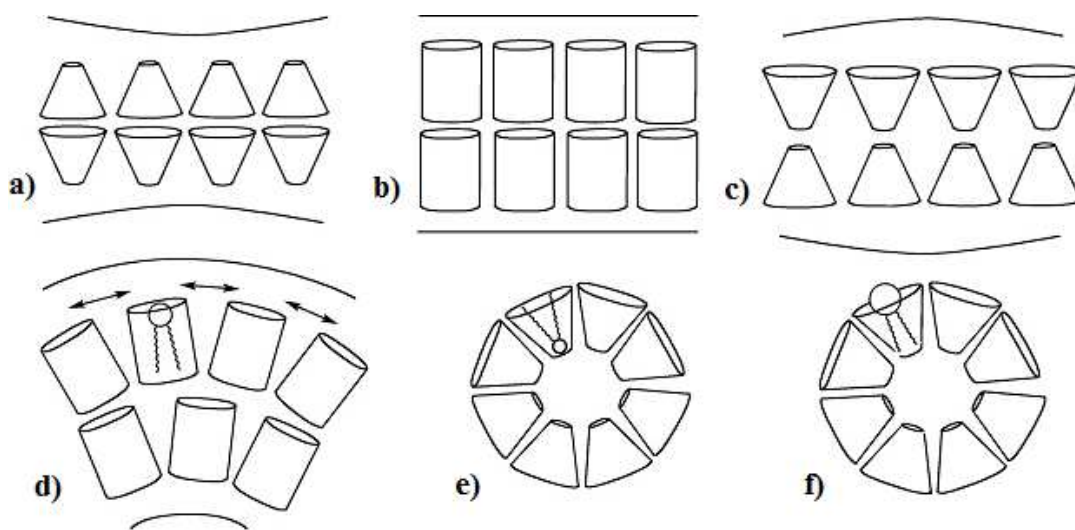


Fig. 4: Schéma membránových dvojvrstev: a) negativní zakřivení (GPEtns), b) lamelární stabilní dvojvrstva (GPC), c) pozitivní zakřivení (lyso-PL), d) napjaté lamelární lipidy v místě vysokého zakřivení, e) invertovaná fáze (hexagonální), f) micela (Atkinson et al., 2008).

Tyto struktury jsou uvedeny jako příklad k poukázání, jak mohou mezimolekulární síly mezi fosfolipidy udržovat normální lamelární dvojvrstvu nebo je tlačit do jiných struktur (Fig. 5). Výsledné napětí membrán se ukázalo být možnou regulační funkcí pro membránově vázané proteiny a enzymy (Epanđ, 1998; Janes, 1996).

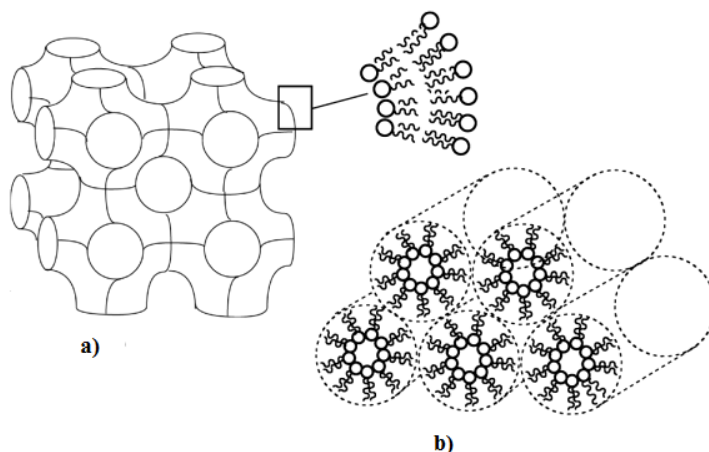


Fig. 5: Nákres a) kubické a b) hexagonální fáze (Atkinson et al., 2008).

2.2.3 Steroly

2.2.3.1 Syntéza, absorpce a transport sterolů u hmyzu

Zoofágní druhy hmyzu jako je např. moucha *Musca domestica* postrádají možnost syntézy sterolů *de novo* a proto musí spoléhat na jejich příjem z potravy. Naproti tomu u některých druhů fytofágního hmyzu mohou být rostlinné steroly, jako jsou sitosterol, kampesterol a stigmasterol dealkylovány na cholesterol nebo blízkce podobné C27 steroly (ploštice tuto schopnost zřejmě ztratily); (Behmer and Nes, 2003), čímž je 24-dealkylační reakce jedním z esenciálních metabolických procesů u fytofágního hmyzu (Fig. 6); (Danielsson and Sjövall, 1985; Ciufu et al., 2011).

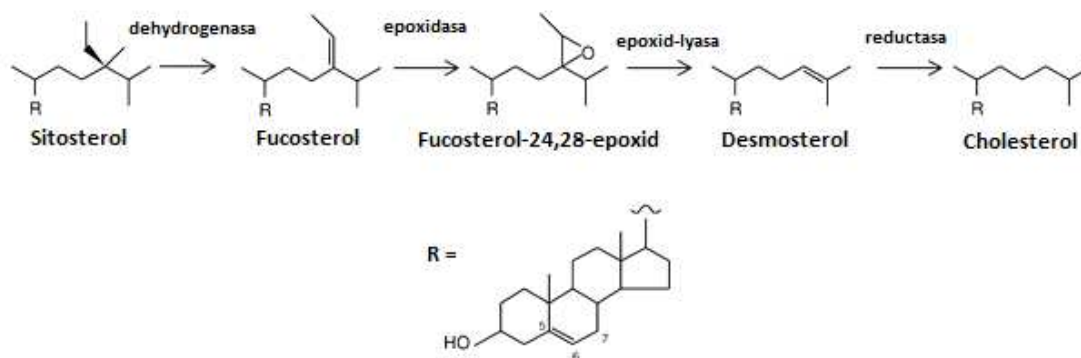


Fig. 6: Schéma procesů 24-dealkylační reakce (Ciufu et al., 2011).

Hlavním místem absorpce sterolů z potravy je u mnoha druhů hmyzu, zvláště pak býložravého, střední část střeva (**Joshi and Agawal, 1977**), u omnivorních druhů jde spíše o přední část či vole. U obratlovců je absorpce sterolů podporována žlučovými solemi, ale hmyz žádné nemá a tak se usuzuje, že jsou steroly zabaleny do směsných micel s fosfolipidy a následně pasivně absorbovány (**Turunen and Crailsheim, 1996**). Četné studie prokázaly, že hmyz může absorbovat cholesterol z potravy jak ve volné formě, tak ve formě esterů, ale následná absorpce malých frakcí volných forem je vystavena intracelulární esterifikaci (**Turunen and Chippendale, 1977**). Esterifikace probíhá ve střevních mikrozomech, tukovém tělese a ve vaječnicích přes acetyl koenzym-A a cholesterol acyltransferázu (ACAT), ale rychlost s jakou jsou esterifikovány je ovlivněna různými úpravami postranního řetězce, počtem a umístěním dvojných vazeb v B-prstenci jádra sterolů. Význam esterifikace je neznámý, ale usuzuje se, že může sloužit jako mechanismus dočasného ukládání sterolů (**Billheimer et al., 1983**).

Po vstřebání do střeva musejí být steroly transportovány skrze hemolymfu k orgánům, kde jsou uloženy či využity. Nicméně hydrofobní povaha sterolů vyžaduje, aby byly cytosolem a hemolymfou převáděny prostřednictvím specializovaného systému přenašečů (**Krebs and Lan, 2003**).

Lipidy hmyzí hemolymfy nejsou ve vodě rozpustné, ale jsou transportovány jako komponenty makromolekulárních komplexů – lipoproteinů, u hmyzu zvaných lipoforinů. Jde hlavně o dvě skupiny: lipoproteiny typu I a II (DGLp I a DGLp II); (**Downer, 1978**). DGLp I se nejčastěji vyskytují v podobě HDLp – D ~ 1,15 g/ml. Každá částice HDLp se skládá ze dvou apolipoforinů: ApoLp I a ApoLp II. Apolipoforin III je volný v hemolymfě nebo spojen LDLp – D ~ 1,03 g/ml a má především stabilizující funkci. HDLp je ale jen jednou ze tří forem lipoforinu, kde každá se liší na základě hustoty. Lipoforin o vysoké hustotě (HDLp) nese steroly a má celkem málo lipidů, zatímco lipoforin o nízké hustotě (LDLp) jich obsahuje více. Třetí forma lipoforinu, lipoforin o velmi vysoké hustotě (VHDLp) je méně běžný a je nejčastější formou vitellogeninu. Lipoforiny mají kulovitý tvar, povrch složený z fosfolipidů a bílkovin, vnitřní jádro složené z diacylglycerolů a menšího množství sterolů, uhlovodíků a karotenoidů. Syntetizuje se v tukovém tělese, ale působí v hemolymfě, kde funguje jako obnovitelný člunek. Hmyzí lipoforiny se totiž na rozdíl od savčích nerozpadají, ale recyklují se. Navíc jsou vysoce univerzální a přenáší rozličné třídy lipidů k rozličným tkáním a místům v organismu (**Canovoso et al., 2001**).

2.2.3.2 Struktura a popis sterolů

Steroly jsou nepolární a tedy ve vodě nerozpustné látky. Vyskytují se buď volně, nebo jsou esterově vázané svojí sekundární alkoholickou skupinou na mastné kyseliny. Jsou esenciální pro organismus a pro funkci membrán. Nejznámějším zástupcem je cholesterol (**Kalač, 2001**).

Steroly vyskytující se u hmyzu se dají charakterizovat pomocí tří rysů: (a) 3 β -hydroxylovou skupinou, (b) tetracyklickým kruhovým systémem a (c) bočním řetězcem 8 - 10 atomů uhlíku ve správné konformaci (Fig. 7); (**Nes et al., 1978**).

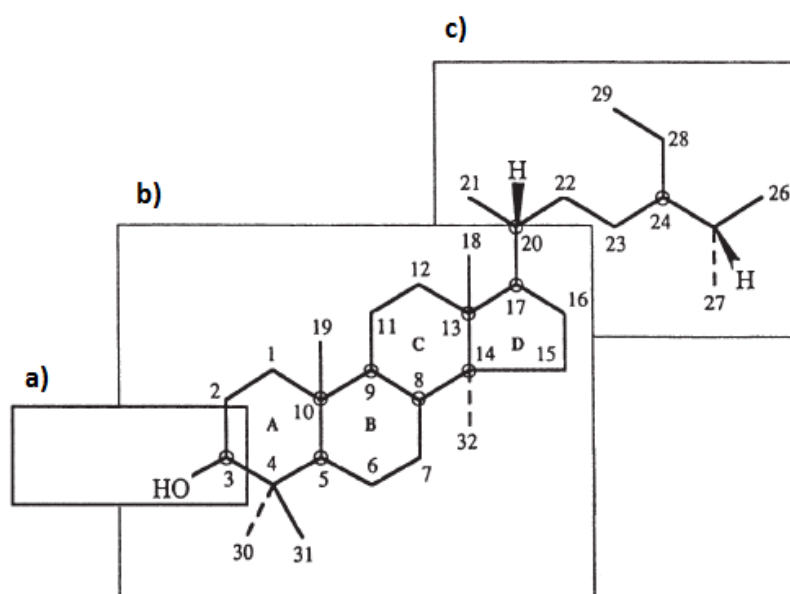


Fig. 7: Systém číslování u sterolů a jejich a), b), c) strukturální domény (Behmer and Nes, 2003).

Polární a nepolární elementy sterolů dávají vznik nestejným povahám částí molekuly. Toto, v kombinaci se správnou orientací polohy postranního řetězce, poskytuje sterolům vhodné vlastnosti pro tvorbu membrány (**Bitmann, 1997**).

2.2.3.2.1 Rostlinné steroly

U rostlin bylo nalezeno okolo 250 různých fytosterolů. Podle rozdělení a stavby sterolů v rostlinách, je možné odhadnout fylogenetické rozdíly ve vývoji a evoluci rostlin. Rostliny obsahující ergosterol v postranním řetězci zastupují spíše primitivní druhy a ty obsahující stigmasterol reprezentují druhy odvozené (**Behmer and Nes, 2003**).

Sitosteroly (řecky sitos - obilí), nejhojnější rostlinné steroly, jsou převážně součástí směsí a jen vzácně se nachází v čisté formě. Nejčastěji tvoří izomer β -sitosterolu.

Dalším významným steroidem je stigmasterol, jehož zdrojem je puchýřnatec jedovatý (*Physostigma venenosum*), odkud dostal své jméno. C28 fytosterolem je kampesterol, který byl izolován také u měkkýšů (Florkin and Stotz, 1963).

Rostlinné steroly jsou strukturně velmi podobné cholesterolu, jak je ukázáno na obrázku 8 (Fig 8), od kterého se liší postranním uspořádáním řetězce na 24. atomu uhlíku C24. Ten navíc není výsadou pouze živočichů, ale je tvořen v malé míře i v rostlinách (Kalač, 2001).

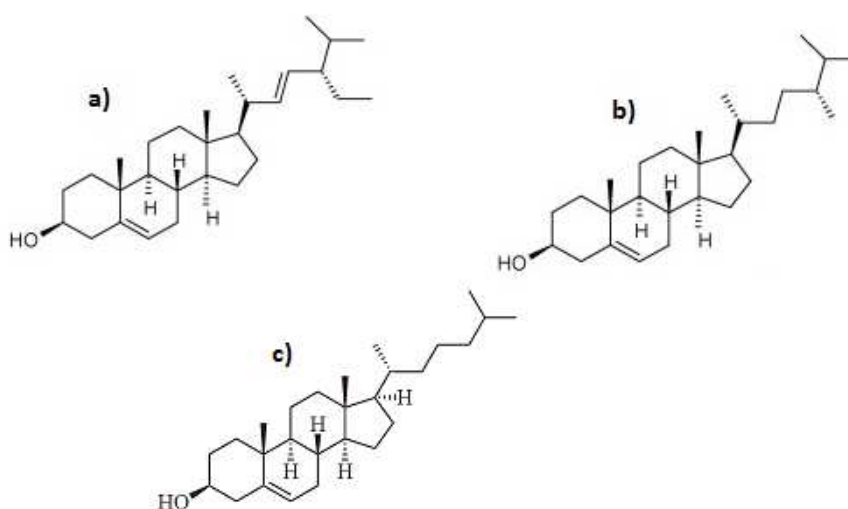


Fig. 8: Schéma: a) stigmasterolu, b) kampesterolu, c) cholesterolu (Ito et al., 2011).

2.2.3.2.2 Cholesterol

Cholesterol (C27 alkohol) je hlavním steroidem ve tkáních obratlovců. Je zvláště hojný v nadledvinkách (až 10 %), nervové tkáni (až 2 %) a játrech (až 0,2 %); (Vance, 2000). Lasser a kolektiv (Lasser et al., 1966) zjistili, že celkové koncentrace sterolů v tkáních švába *Eurycotis floridana*, byly podobné, ale s mírně nižší koncentrací než u sterolů nalezených v tkáních obratlovců. Nejvyšší koncentrace cholesterolu se nacházely v mozkové tkáni a slinných žlázách, dále pak ve střevě, malpighických tubicích a v tukovém tělese. Nejnižší koncentrace byla naměřena ve svalech. Nervová tkáň navíc vykazuje selektivní absorpci cholesterolu, pokud je ho nedostatek (Ba et al. 1995). Z mozkové tkáně u larvy *M. domestica* se resorbovalo 6x více cholesterolu než sitosterolu, ostatní tkáně (tukové těleso a sval) měli naopak vyšší poměr sitosterolu než cholesterolu (Dwivedy, 1993).

Obsah a složení sterolů se může měnit mezi oběma pohlavími i mezi jednotlivými vývojovými stádii. U švába *Eurycotis Floridana* bylo naměřeno 3x vyšší množství

cholesterolu v reprodukčních orgánech samic v porovnání se samčími pohlavními orgány (Lasser et al., 1966). U mravence *Solenopsis invicta* se složení sterolů mění s vývojovým stádiem (vajíčko, larva, dělnice nebo královna). Vajíčka obsahovala nejvíce cholesterolu (45 % z celkových sterolů), u královny převažoval sitosterol (54 % z celkových sterolů) a u larev se složení podobalo složení vajíček (50 % cholesterolu z celkových sterolů); (Ba et al., 1995). Cholesterol je ve vajíčkách důležitý zřejmě proto, že slouží jako prekurzor ekdysteroidů, které regulují procesy během embryonálního vývoje (Sall et al., 1983; Svoboda, 1994).

2.2.3.3 Prekurzory hormonů a vitamínů

Jak již bylo řečeno v úvodu, steroly hrají u hmyzu mnoho komplexních rolí (Fig. 9).

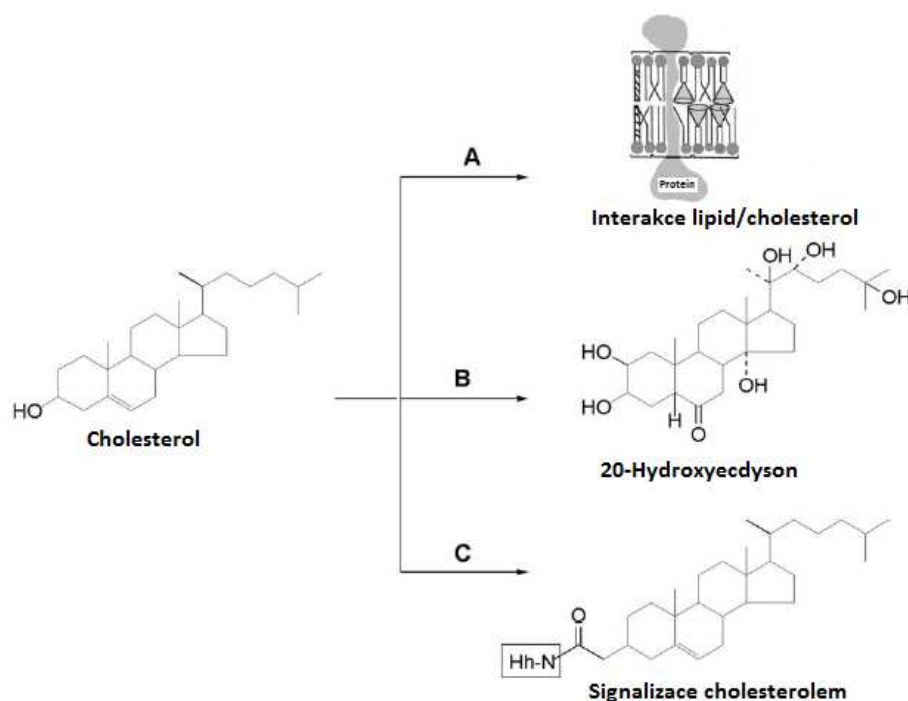


Fig. 9: Dráhy uplatnění cholesterolu (Behmer and Nes, 2003).

Tato práce je směřována na jejich funkci v buněčné membráně, ale dovolím si zde uvést stručně i jejich další role: (a) prekurzory k svlékacím hormonům ekdysteroidům a vitamínům rozpustných v tucích a (b) signální molekula vázaná k proteinům ovlivňujících vývoj (Svoboda, 1994).

Díky stavbě své molekuly jsou důležitými prekurzory steroidních hormonů řídící svlékání u hmyzu. Biosyntéza zoekdysteroidů začíná u 24-dealkylace fytoosterolů ve střevech všežravého a býložravého hmyzu až postupně vznikne cholesterol. Cholesterol

se změní buď postupně přes 5 β -ketodiol a 2-deoxyecdyson na ekdyson v protorakálních žlázách, nebo především v hemolymfě postupně přes 5 β -diketol a 3-dehydroekdyson na ekdyson. Ten se pak v povrchových tkáních v protorakálních žlázách přemění po hydroxylaci katalyzovanou ekdyson-20-monooxygenázou z ekdysonu na 20-hydroxyekdyson (**Pavlík et al., 2010**).

Dále jsou steroly prekurzory vitamínů rozpustných v tucích. Vitamín D se dostává do těla vystavením pokožky slunečnímu záření (UVB), kdy je převeden 7-dehydrocholesterol na provitamín D3 a spontánní izomerací na cholekalciferol - vitamín D3. 7-dehydrocholesterol je velmi blízkým prekurzorem cholesterolu (**Henry, 2011**).

2.2.3.4 Steroly v membránách

Cholesterol je často rozmístěn nenáhodně ve specifických doménách biologických membrán (**Arora et al., 2004**). Hodně svých aktivit vykonává díky udržování specializovaných typů membránových mikrodomén (tzv. lipidových raftů) ve funkčním stádiu. Lipidové rafty byly definovány jako postranní extrahovatelné lipidové struktury na ploše membrány. Jsou obohaceny o glykolipidy, cholesterol, sfingolipidy a specifické proteiny, které jsou často zahrnuty v signalizaci buněčné membrány. Formují se během biosyntézy v Golgiho komplexu, odkud jsou poté dopravovány na plasmatickou membránu (**Goot and Harder, 2001; Brown and London, 1998**).

Steroly se u hmyzu nachází v mikrozomech, kombinaci membránových systémů (**Short et al., 1996**), což souhlasí s úvahou, že hlavní úlohou sterolů je stavební funkce. Ve svých membránách může strukturně využít i sitosterol společně s cholesterolem, pokud metylová skupina na sitosterolu neprodlužuje postranní řetězec přes její funkční limity (Fig. 10); (**Danielsson and Sjövall, 1985**). Například u *D. melanogaster* je hlavním sterolem v membránách ergosterol (až 69 % z celkových sterolů); (**Rietveld et al., 1999**).

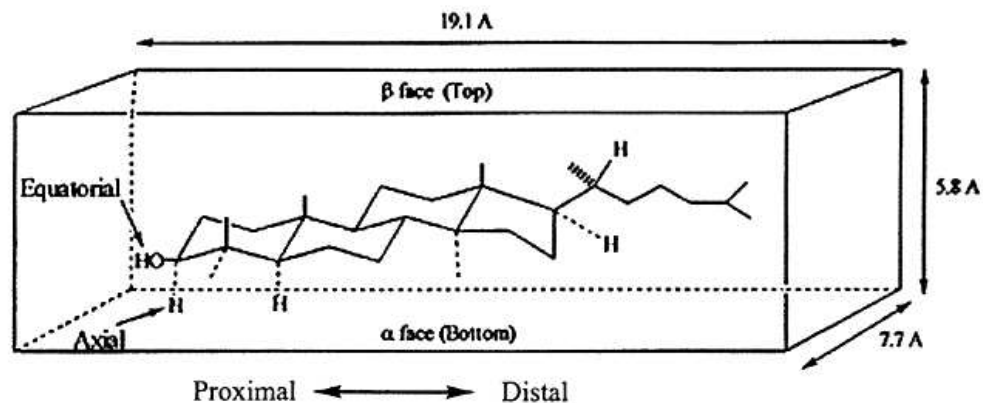


Fig. 10: Prostorová struktura molekuly rostlinného sterolu (Behmer and Nes, 2003).

Množství sterolů v tkáních nalezené ve většině zkoumaných organismů je pozoruhodně konstantní (Tab. 1). Šlo většinou o množství okolo 0,1 %, kromě nadledvinek, kde se později zjistilo, že jde o esterifikované formy. Zatím nebyla změřena eukaryotická buňka, u které by byl obsah sterolů nižší než 0,01 %. Jediná nižší naměřená hodnota byla u sinic, které jsou ale prokaryotické. Na několika případech byl prozkoumán i obsah sterolů v membránách (Tab. 2). Množství v membránách eukaryot je v rozmezí od 2 – 25 % z celkových membránových lipidů (Nes, 1974). Ve studii na lidských spermích nebyl zjištěn žádný fázový přechod lipidů. Toto chování je typické pro membrány, které obsahují vysoký podíl cholesterolu, jak u nich bylo později naměřeno (Drobnis et al. 1993).

Tabulka 1: Obsah sterolů ve tkáních (Nes, 1974)

Organismus / tkáň	Procenta
Sasanka	0,07
Hlemýžď	0,03 – 0,13
Korýši	0,03 – 0,5
Žížala	0,1
Mořský kroužkovec	0,3 – 0,05
Kapr	0,07
Žába	0,04
Krysa	0,1
Člověk	0,3 – 0,6
Mozková kůra	1,2
Srdce	0,2
Játra	0,3 – 0,6
Červené krvinky	0,1
Nadledvinky	3 – 10

Tabulka 2: Obsah sterolů v membránách (Nes, 1974)

Membrána	Procenta
Myelin	25
Č. krvinka	25
Jaterní buňka	14 – 17
Endoplazmatické r.	6 – 8
Mitochondrie	2 – 5
<i>Escherichia coli</i>	0

2.2.4 Tokoly

V organismu hrají tokoly dvě hlavní funkce. Jsou antioxidanty chránící tkáň a zvláště nenasycené mastné kyseliny před narušujícími účinky volných, obzvláště kyslíkových radikálů. Druhou rolí je stabilizace struktur membrány díky tvorbě komplexů s destabilizujícími molekulami a tím pádem ochrana narušení rovnováhy ve struktuře (**Liebler, 1993**).

Tokoly jsou absorbovány ze střeva a začleňovány do chylomikronů. Ty jsou metabolizovány lipoproteinovými lipázami a následně dodány a uloženy do jater. Poté jsou transportovány do celého těla jako součást plazmatických lipoproteinů. Lipoprotein nosící většinu tokolů nenavazuje jejich izomery rovnoměrně (**Traber, 1994**).

2.2.4.1 Názvosloví a struktura vitamínu E

Jako obecný popis všech tokolů a tokotrienolů se používá vitamín E. Jsou charakterizovány stavbou chromanolového prstence v postranním řetězci. Tokoferoly se dělí na α , β , γ a δ formu. Deriváty α -tokoferolů se liší jen v počtu a uspořádání metylových skupin okolo benzenového jádra. Další látky obsahující tři dvojné vazby v postranním řetězci na atomech uhlíku C3, C7 a C11 byly pojmenovány tokotrienoly. Ty stejně jako tokoferoly mají α , β , γ a δ formu (Fig. 11); (**Pennock et al, 1964**; **Whittle et al., 1966**).

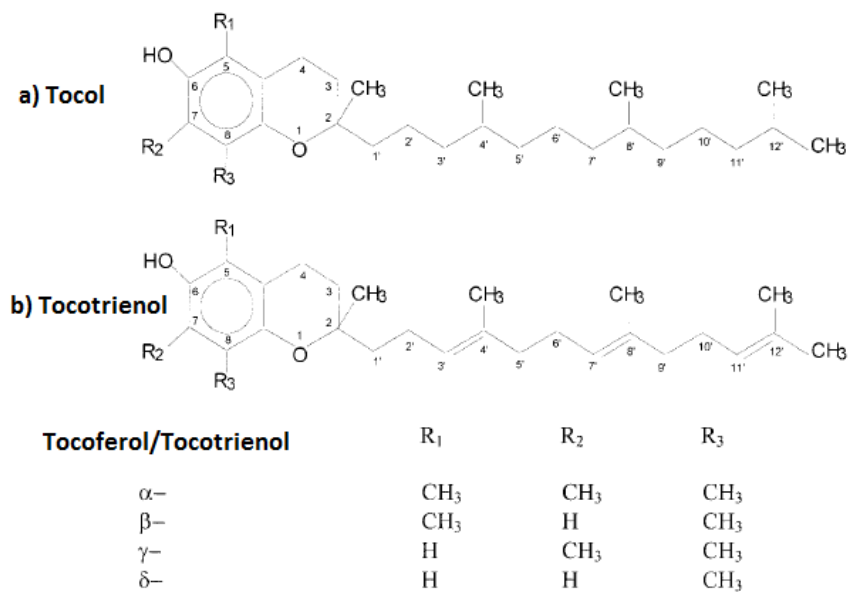


Fig. 11: Schéma: a) tokoferolu, b) tokotrienolu (Wang and Quinn, 1999).

2.2.4.2 Antioxidační funkce tokolů

α-tokoferol a γ-tokoferol představují základní složky buněčné obrany proti volným endogenním a exogenním radikálům (Fig. 12); (Wang and Quinn, 1999).

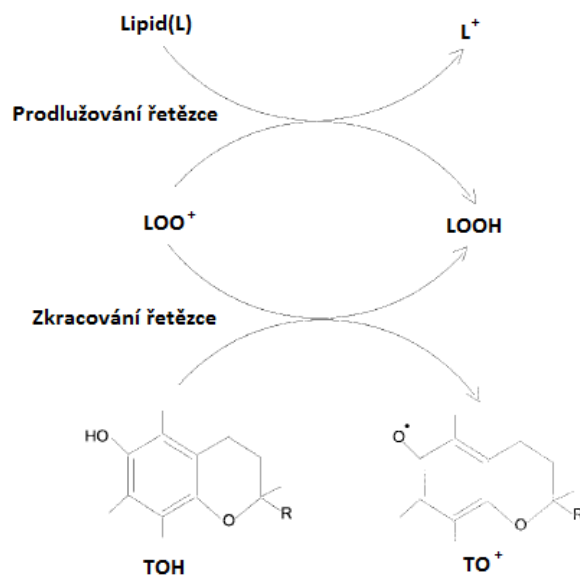


Fig. 12: Neenzymatická antioxidační reakce α-tokoferolu (Wang and Quinn, 1999).

Tokoly chrání lipidy před peroxidací. Zatím není zjištěno, zda brání nějakou konkrétní membránovou třídu fosfolipidů ve větší či menší míře, než jinou, neboť

doposud toto téma zkoumalo jen pár studií. Je ale známo, že chrání hlavně lipidy s navázanými nenasycenými mastnými kyselinami (hlavně lipidy obsahující linoleovou, arachidonovou, dokosaheptaenovou kyselinu (DHA)). Toto se odráží v našem vědomí, že díky tokoferolu je dobré přijímat nenasycené mastné kyseliny (Allard et al., 1997).

Při studiu antioxidační role α -tokoferolu v dvojvrstvě se zaměřuje pozornost na 3 vlastnosti: (a) Hloubku průniku polární chromanolové skupiny a orientaci celé molekuly s ohledem na množství fosfolipidů, (b) dynamiku pohybů α -tokoferolu v dvojvrstvě a (c) spojování α -tokoferolu s určitými lipidy nebo lipidickými doménami (Atkinson et al., 2008). Objasnění antioxidační aktivity musí být vysvětleno nějakými strukturními mechanismy. Za tímto účelem navrhl Fukuzawa (Fukuzawa et al., 1993) 3 modely. V modelu (a); (Fig. 13a) je fenol-hydroxylová skupina umístěna na rozhraní membrány a je přístupná akorbátu. V modelu (b); (Fig. 13b) je chromanolová skupina zanořena více do membrány a dovoluje navázání vodíku na fosfátový kyslík nebo na esterový kyslík. Model (c); (Fig. 13c) má chromanol hluboce zanořen do dvojvrstvy, blíže k nenasycené straně a může vytvářet radikály během oxidace nenasycených mastných kyselin.

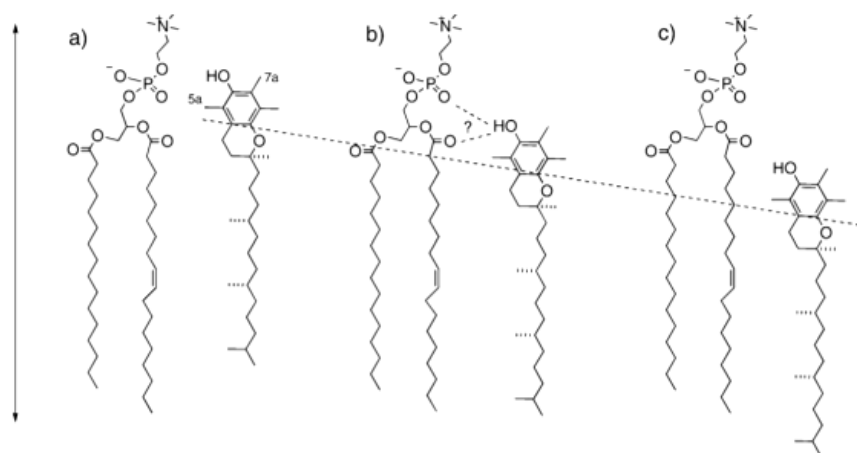


Fig. 13: Schéma 3 modelů zanoření tokoferolu v membráně (Atkinson et al., 2008).

2.2.4.3 Strukturní funkce tokolů

Strukturní role tokoferolu v membránách je podobná roli cholesterolu. Cholesterol má silnou tendenci pojit se s nasycenými fosfolipidovými fázemi, což vede k poruchám gelové fáze a změně na tekutě-krytalinní fázi (Vist and Davis, 1990), zatímco α -tokoferol se pojí spíše s nenasycenými fosfolipidy a podobně řídí kapalně-krytalinní fáze. Tento stabilizační efekt je větší u tokotrienolů než u tokoferolů (Suzuki et al.,

1993), protože mají více polární řetězce než nasycené postranní řetězce tokoferolů. Délka postranního řetězce α -tokoferolu napomáhá při navazování s nenasycenými částmi membrán. Právě tokoferol-FA komplexy, jsou důvodem, proč se rozděluje do fází ve fosfolipidových membránách. Membrány bohaté na mastné kyseliny zvýhodňují přítomnost tokolů, tj. flexibilní řetězce FA poskytují vhodné prostředí pro boční řetězce tokoferolů a tokotrienolů (Kagan et al., 1990).

Při tvorbě lipidových raftů vyvstává otázka, zda tokoferol upřednostňuje trvání na jejich oddělené doméně nebo ne. Pokud ano, mělo by to dva následky. (a) Koncentrace tokoferolu bude v některých lokalitách membrány vyšší než v jiných a (b) pokud se proteiny agregují do specifických raftů, blízkost tokoferolu ovlivňuje jen některé proteiny a jiné ne. Druhý bod vysvětluje, proč některé tokoly (α -, β -, γ -tokoferol) mají rozdílné efekty na buňku nebo enzymovou aktivitu. Například pokud non- α -tokoferol nemá stejnou schopnost se dělit do stejných membránových domén jako α -tokoferol, pak se nemůže očekávat, že mají stejné biologické účinky. Přednostní dělení α -tokoferolu do jiných lipidových fází bylo demonstrováno pomocí několika technik (fluorescenční spektrofotometrie, DSC), kdy se měřil efekt tokoferolů a tokotrienolů na teplotní fázové přechody dielaidoylfosfatidyletanolaminu (DEPE) obsahující malé množství tokolů. Ukázka DSC scanů pro α -tokoferol a α -tokotrienol je ukázána na obrázku 14 (Fig. 14); (Atkinson et al., 2008).

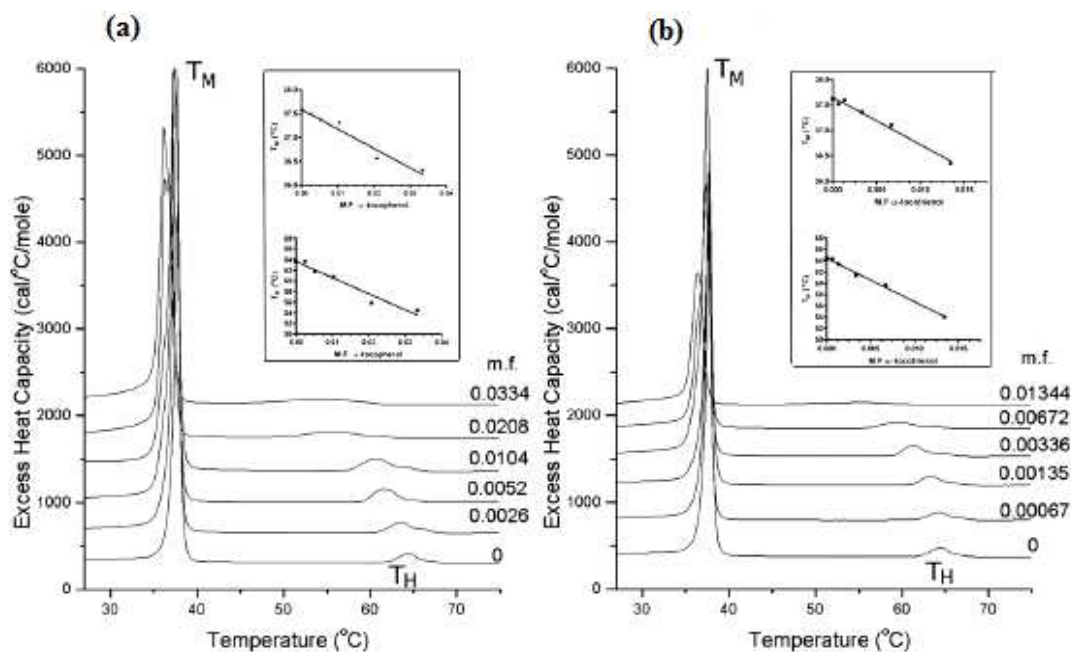


Fig. 14: Scany α -tokoferolu (a) a α -tokotrienolu (b); (Atkinson et al., 2008).

Tokoferol má v membránách efekt na laterální tlaky v místech membrány s vysokým zakřivením, díky spojení s jinými lipidy jako třeba lysofosfolipidy. Nedávná pozorování používající zobrazovací hmotnostní spektrometrii ukázala, že α -tokoferol je častěji ve velmi zakřivených částech buněčné membrány na somato-neuritickém spojení. Umístění tokoferolů ve fosfolipidové membráně tedy není řízeno pouze přítomností nenasycených řetězců mastných kyselin, ale také díky formě sestavování lipidů a celkovému zakřivení membrány. Z tohoto důvodu α -tokoferol chrání membránu proti destabilizujícím účinkům lysofosfolipidů jako je lysofosfatidylcholin (LPC); (**Kogure et al., 2003**). Povaha spojování tokoferolů s lysofosfolipidy je nejlépe naznačena, jako kombinace doplňovaných tvarů což je uvedeno na obrázku 15 (Fig. 15); (**Erin et al., 1986**).

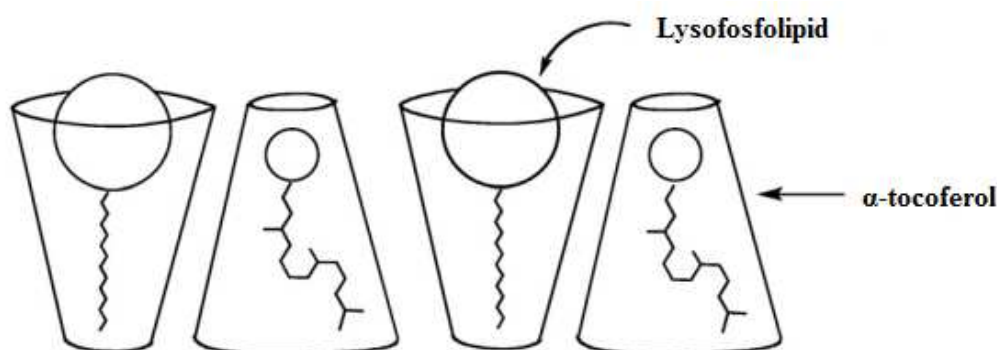


Fig. 15: Zobrazení skládání tokoferolu s lysofosfolipidy (Atkinson et al., 2008).

2.3 Ruměnice pospolná (*Pyrrhocoris apterus*)

Čeď Pyrrhocoridae zahrnuje převážně fytofágní ploštice. Většina druhů je spíše subtropická, ale *Pyrrhocoris apterus* (Fig. 16) je jeden z mála druhů žijících v temperátní zóně. Díky své krátké generační době a nenáročným podmínkám chovu se stal významným fyziologickým modelem. Důležitou vlastností tohoto druhu je také jeho dimorfismus. V přírodě jsou známy dvě formy této ploštice: krátkokřídlá (brachypterní) a dlouhokřídlá (makropterní). Obě dvě formy se výrazně liší jak ve fyziologii, tak v chování. Makropterní forma je recesivní a rozmnožování je obvykle indukováno až krátkou fotoperiodou či vystavením chladu, což je také důvod proč má delší životní cyklus. V laboratoři se podařilo díky fotoperiodickým podmínkám vytvořit třetí morfu – diapauzní (**Urban, 2010**).



Fig. 16: *Pyrrhocoris apterus* (Zicha, 2012).

2.3.1 Sezónní adaptace ruměnice pospolné

Brachypterní dospělci *P. apterus* zastavují vývoj gonád a veškeré reprodukční aktivity a vstupují do reprodukční diapauzy po vnímání kriticky krátkého dne (méně než 16:30 hodin světla a 7:30 hodin tmy). Během iniciační fáze si diapauzní jedinci hromadí energetické zásoby ve formě lipidů, glykogenu a hexamerních proteinů a zároveň postupně klesá rychlost jejich metabolismu. Jedinci poté hledají stanoviště pro přezimování v napadaných listech a hrabance. Jejich pohybová aktivita, příjem potravy a trávení postupně klesají. Diapauza je udržovaná během podzimu a je postupně ukončována během zimy tak, že většina dospělců dosáhne konce diapauzy během ledna. *Pyrrhocoris apterus* netoleruje zmrznutí tělních tekutin, přežívá však dobře několikadenní vystavení teplotám blízko SCP v podchlazeném stavu (Šlachta, 2003). V průběhu chladných zimních měsíců jsou ruměnice udržovány ve stádiu post-diapauzní kviescence a obnovení jejich reprodukce je pozastaveno do nástupu vyšších teplot začátkem jara (Tollarová, 2005). Při teplotách pod 5°C je glykogen částečně konvertován na polyoly, hlavně na ribitol a sorbitol. Kromě toho se během chladové aklimace přestavuje složení fosfolipidů v jejich membránách (Košťál et al., 2011).

Hodková (Hodková et al., 2002) ve své studii dokázala, že u *P. apterus* s příchodem kratších dnů a nižších teplot dochází ke zvýšení hladiny GPEtns. Tuto studii podporují výsledky studie (Tomčala et al., 2006), kdy nejvýraznějším rozdílem v komplexu změn

při chladové aklimaci *P. apterus* byl nárůst proporcí GPEtns na úkor poklesu GPCholinu.

Vliv sterolů a tokoferolů na chladovou aklimaci *P. apterus* nebyl dosud prostudována a proto jsme na toto téma zaměřili svoji pozornost.

3. Cíle práce

Cílem práce bylo vyplnit mezeru v poznání remodelace membrán u hmyzu během sezóny studiem složení sterolů a tokoferolů u ruměnice pospolné, *Pyrrhocoris apterus* a pokusit se odpovědět na tři otázky. 1. Jaké druhy sterolů obsahují tkáň ruměnice, dále pak 2. jaké množství sterolů obsahují a neposledně 3. jaké jsou sezonní změny v jejich relativním zastoupení.

4. Praktická část

4.1 Metodika

4.1.1 Sběr pokusných jedinců

Sběr pokusných brachypterních jedinců *Pyrrhocoris apterus* probíhal v parku Stromovka v Českých Budějovicích a jeho okolí. Celkem se jednalo o 8 sběrů během celého roku, kdy bylo třeba 12 jedinců (6 samic a 6 samců) pro každé určené datum (Tab. 3). Vzorky z 20. a 28. června byly sesbírány v období, kdy se měla v přírodě vyskytovat nediapauzní populace. Ta byla také použita, protože 20. června byly odebírány jen pářící se páry, které byly posléze odděleny. Vzorky z 28. června byly nasbírány jako larvy 5. instaru a následně odchovány. Pokud nebyly odebrané plošnice přímo použity k pitvě, byly dočasně umístěny ve venkovní kleci.

Tabulka 3: Sběr jedinců *P. apterus*

	Datum sběru	Vývojové/ reprodukční stadium*
Přezimující generace	18.1	konec reprodukční diapauzy / post-diapauza kviesence
	10.3	post-diapauza kviesence
	20.5	reprodukce (shromážděny pářící se páry)
1. generace	20.6	reprodukce (pářící se páry shromážděny z terénu)
	28.6	reprodukce (sebrány larvy 5. instaru, dochovány ve venkovní kleci a odebrány jako pářící se páry)
Směs 1. a 2. generace	17.9	udržování reprodukční diapauzy, teplotní aklimatizace
	1.11	udržování / ukončení reprodukční diapauzy, chladová aklimatizace
	7.12	ukončení reprodukční diapauzy, chladová aklimatizace

* Fyziologické stádium bylo přímo pozorováno (reprodukce)

4.1.2 Extrakce lipidů (Folchova metoda)

Pro extrakci (Folch et al., 1957) byli použiti 3 samci pro vzorek tukového tělesa a létacího svalu (thoraxu) vzorků A, další 3 samci pro vzorky B a 2x po 3 samicích pro vzorky C a D. Po pitvě následovala SPE frakcionace.

Extrakční medium (EM): chloroform:metanol (2:1), (použit chloroform stabilizovaný 1% etanolem)

Použité chemikálie: chloroform: Fluka, 99,8%, stabilizovaný 1% etanolem

metanol: Penta, 99,9%

NaCl: Lachema, 99,9%

voda: deionizovaná

- 1) Vypreparovanou tkáň dát do 1 mL EM v 5 mL teflonových skleněných homogenizátorech, které jsou stále na ledu.
- 2) Homogenizovat na ledu.
- 3) Centrifugovat při 3000g po dobu 6 min (lepší je použít chlazenou centrifugu) a sebrat supernatant S1 do skleněné centrifugační zkumavky.
- 4) Rehomogenizovat pelet s nově přidaným 1 mL EM.
- 5) Recentrifugovat při 3000g po dobu 6 min a sebrat supernatant S2 a přidat ho k S1.
- 6) Přidat 0,4 mL 0,9% NaCl a důkladně promíchat pomocí skleněné tyčinky.
- 7) Centrifugovat při 3000g po dobu 10 min a poté sebrat horní organickou fází obsahující lipidy do skleněné vialky s teflonovým víčkem.
- 8) Vzorky vysušit pod proudem N₂ a při 35°C, poté vialky zavřít a uložit do mrazáku při -80°C.

4.1.1 SPE frakcionace

SPE frakcionace slouží k oddělování fází v závislosti na zvolené kolonce a rozpouštědlech. Z frakce PL byly kvantifikovány celkové fosfolipidy. Frakce SE, TG a S byly analyzovány v Laboratoři analytické biochemie (BCLAB) Entomologického ústavu Biologického centra v Českých Budějovicích.

- 1) Přidat ke vzorku (za sucha) 2.5 μ L IS a odsušit krátce pod N₂.
- 2) Přidat 1 mL hexanu, protřepat a potom přidat 2 mL acetonitrilu, opět důkladně protřepat, nechat oddělit fáze = ca. 2 min.
- 3) Během oddělování fází aktivovat kolonku = aplikovat 2 x 1 mL hexanu, pod tlakem – vyhodit **X**.
- 4) Odebrat 2x 1 mL (první odběr bude celý 1mL a druhý odběr bude kvůli splývání fází necelý 1 mL) spodní acetonitrilové fáze = uložit první odběr jako **PL** (fosfolipidy) a druhý jako **PL•**.
- 5) Nanést vzorek: 500 μ L horní hexanové fáze, pod mírným tlakem nechat dojít přesně k hornímu kraji kolonky – eluát vyhodit **X**. Změnit pozici kolonky.
- 6) Nanést 1 mL hexanu, pod tlakem nechat úplně projít – uložit jako **SE** (sterol-estery). Změnit pozici kolonky.
- 7) Nanést 1 mL hexan-dichlórmetanu, pod tlakem nechat úplně projít – uložit jako **TG** (triglyceridy). Změnit pozici kolonky.
- 8) Nanést 1 mL hexan-etylacetátu, pod tlakem nechat úplně projít – uložit jako **S** (steroly).
- 9) Zastavit tlak, rozebrat Baker, zavíčkovat vzorky a uložit v -80°C (později odpařit na SpeedVacu.

Kalibrační křivka

Před kvantifikací celkových fosfolipidů pomocí mineralizace a spektrofotometrického měření byla vypracována kalibrační křivka, aby se vyzkoušel postup a měření. Výsledek této křivky je uveden v grafu 1.

a) Rozpustit 0.1361 g KH_2PO_4 (m. w. 136.1) v 1 L pro dosažení 1 mM roztoku (68.1 mg in 500 mL).

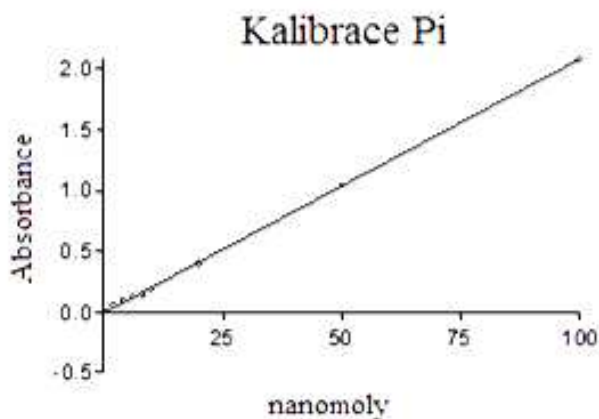
b) Připravit standardy (Tab. 4)

Tabulka 4: Poměry míchání a koncentrace při tvorbě kalibrační křivky.

konc. (mM Pi)	1 mM roztok [μL]	voda [mL]	obsah (nmol Pi/100 μL)
0	0	10000	0
10	100	9900	1
20	200	9800	2
40	400	9600	4
60	600	9400	6
80	800	9200	8
100	1000	9000	10
200	2000	8000	20
500	5000	5000	50
1000	10000	0	100

c) Vzít 100 μL z každého standardu a dát ho do skleněné centrifugační zkumavky a potupovat normálně jako se vzorkem (vypařování vody ale trvá mnohem déle než vypařování roztoku Chl:Met).

Graf 1.: Kalibrační křivka



Jak je z grafu 1. patrné, je tato metoda na měření fosfolipidů dostatečně přesná.

Naše výsledky kvantifikace celkových fosfolipidů a výsledky analýzy fosfolipidů změřené v BCLAB pomocí metody HPLC-MS, jež je uvedena v kapitole 4.1.5., byly vzájemně porovnány. Obě dvě měření se ve výsledcích velmi shodovala.

4.1.2 Kvantifikace celkových fosfolipidů

Při mineralizaci bylo nejdříve před postupem ke všem vzorkům přidáno 1 mL roztoku chloroform:metanol (2:1). Použit byl chloroform stabilizovaný 1% etanolem. Následuje popis práce dle zavedeného laboratorního postupu:

- 1) Vzít 200 μL vzorku (tukové těleso nebo l. sval; = 1/10 celku) a přenést do centrifugační skleněné zkumavky, stočit pokud je nutné.
- 2) Vypařit do sucha při 70 °C za použití N_2 (nebo minimálně vakuum); následně 30 min držet na 90 °C, poté nechladit a pokračovat rovnou k dalšímu kroku.
- 3) Přidat 125 μL 70 % kyseliny perchlorové (HClO_4).
- 4) Mineralizovat vzorek při 150 °C po dobu 30 min. (začít na ca. 100 °C, čas počítat při dosažení 150°C), poté zchladit na pokojovou teplotu (ca. 15 min); (během mineralizace a chlazení připravit roztoky molybdátu a askorbátu, zároveň začít zahřívat vodu ve vodní lázni a zapnout spektrofotometr).
- 5) Přidat ke vzorku destilovanou vodu do množství 1 mL (asi okolo 900 μL).
- 6) Přidat 125 μL 2,5 % tetrahydrátu molybdátu amonného $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, zvortexovat (50 mg Mo/1950 μL vody = na 16 vzorků).
- 7) Přidat 125 μL 10 % kyseliny askorbové, zvortexovat (200 mg ask./1800 μL vody = 16 vzorků).
- 8) Povařit po dobu 5 min. ve vodní lázni.
- 9) Zchladit ve studené vodní lázni a centrifugovat při 500 g/20 °C/10 min.
- 10) Změřit absorbanci při 820 nm.

4.1.3 Analýza sterolů, tokoferolů a fosfolipidů v BCLAB

Naše vzorky SE, S, TG a PL byly předány do Laboratoře analytické biochemie (BCLAB) Entomologického ústavu Biologického centra v ČB k analýze. Analýzu PL prováděla Petra Berková a analýzu S a vitamínu E prováděla Lucie Řimnáčová.

Suchá frakce po SPE (obsahující steroly a tokoferoly) byla rozpuštěna v 250 μ l směsi pyridinu a isooktanu (poměr 1 : 9) a k tomu byla přidána směs TFECF (trifluoroethyl chloroformiát) s isooktanem (poměr 3 : 97). TFECF byl použit jako derivatizační činidlo (Původ: Aneclab, ČB, ČR). Dále bylo přidáno 100 μ l 250 mM HCl a po promíchání se odebrala horní organická vrstva do vialky. 1 μ l této organické vrstvy byl nadávkován na GC/MS systém (Thermo Fisher Scientific, San José, CA, USA) vybavený EI ionizací a Xcalibur Core software v. 2.0 pro procesování dat. Vzorek byl dávkován ve splitless modu a teplota injektoru byla 280°C. GC-kolona byla Agilent DB – 1HT, 15 m \times 0.25 mm i.d., 0,1 μ m tloušťka filmu (HPST, Praha, ČR). Teplotní program byl následující: 180°C po 1 min, po 30°C/min do 330°C po 2 min. Průtok helia byl 1.1 ml/min, iontový zdroj byl na 250°C a transferlajna 300°C. Vyhodnocování sterolů a tokoferolů bylo kvantifikováno na vnitřní standard - cholesterol 2C13 (2,5 nmol).

Před měřením fosfolipidů byla nutná příprava vzorků (odpařeno do sucha, rozpuštěno v MeOH, přidán interní standard). Poté následovalo měření pomocí HPLC-MS, vybaveném autosamplermem HTC PAL (Zwinger, Switzerland) a Rheos Allegro pumpou (Basel, Switzerland). Pro zpracování dat byl použit Xcalibur Core software, version 2.0. K ionizaci vzorku se použila ESI elektrosprej v pozitivním módu. Vyhodnocování probíhalo vztahením jednotlivých druhů fosfolipidů na strukturně podobné vnitřní standardy, poté byly přepočteny na moly a suma byla uvedena jako celkové množství fosfolipidů ve vzorku.

4.1.4 Zpracování dat a statistické analýzy

Relativní množství sterolů a tokoferolů ve tkáních bylo vypočteno jako molární procento, kdy na každých 100 molekul PLs se vyskytuje X molekul sterolů nebo tokoferolů. Vliv sezóny na relativní množství sterolů a tokoferolů v tkáních byl statisticky analyzován pomocí jednosměrné ANOVA a následných Bonferroniho testů. Analýzy byly provedeny pomocí softwaru Prism.V.4.

5. Výsledky

Byly detekovány tři různé steroly ve tkáních *P. apterus*. Jedná se o živočišný cholesterol a poté dva fytoosteroly, kampesterol a sitosterol. Dále byly ve tkáních *P. apterus* zjištěny dva izomery tokoferolu: δ -tokoferol a γ -tokoferol.

Celkové množství sterolů v obou tkáních se pohybovalo od 0,2 molárních procent (dále jen %) do 15,2 %. Šlo o rozmezí od 0,2 do 8 % pro thorax a o rozmezí od 0,5 do 15,2 % pro tukové těleso. Konkrétní sezónní změny množství sterolů a tokoferolů pro thorax jsou ukázány v grafu 2. a pro tukové těleso v grafu 3. Číselně jsou hodnoty sterolů a tokoferolů vyjádřeny v tabulce 5 pro thorax a tabulce 6 pro tukové těleso.

Tabulka 5: Hodnoty v thoraxu

Kampesterol	Sitosterol	Cholesterol	δ-Tokoferol	γ-Tokoferol
molární %	molární %	molární %	molární %	molární %
1,6675	6,6799	0,1967	0,1913	6,9129
1,3385	5,5343	0,2652	0,2614	5,329
1,1633	5,1179	0,3678	0,3575	6,3313
1,5158	5,3242	0,3091	0,0954	3,0444
1,7471	6,3301	0,3145	0,2114	5,068
1,8792	6,3198	0,168	0,6308	7,8285
2,5045	8,0035	0,3049	1,3166	8,6084
2,3796	7,7479	0,3885	0,8118	7,5771

Tabulka 6: Hodnoty v tukovém tělese

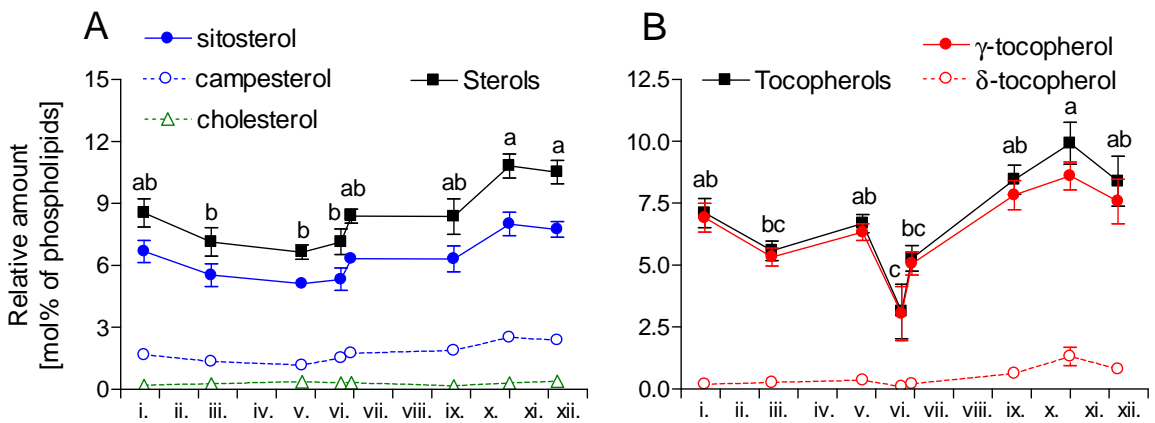
Kampesterol	Sitosterol	Cholesterol	δ-Tokoferol	γ-Tokoferol
molární %	molární %	molární %	molární %	molární %
2,6210	9,6458	0,6417	0,8230	26,1429
1,9193	11,7162	0,6214	1,1855	28,8747
1,5380	6,8080	0,5254	0,5221	12,6287
1,5901	8,1809	0,6115	0,3288	9,0993
1,9798	8,9295	0,8119	0,4189	9,9177
1,7871	9,8330	0,4626	2,2701	25,6317
2,5128	8,1614	0,4318	4,3704	18,6594
4,5866	15,2187	0,7346	5,4779	31,3047

Obsah cholesterolu byl poměrně nízký, jednalo se o rozmezí 0,2 - 0,4 % v thoraxu a 0,5 – 0,8 % v tukovém tělese. Další dva rostlinné steroly byli četnější, u kampesterolu

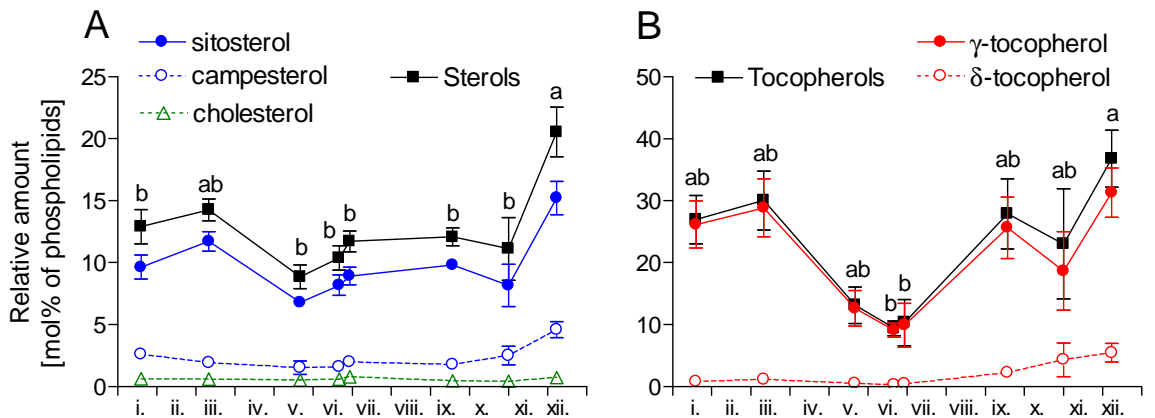
šlo o 1,2 – 2,5 % v thoraxu a 1,5 – 4,6 % v tukovém tělese. U sitosterolu to bylo 5,1 – 8 % pro thorax a 6,8 – 15,2 % pro tukové těleso.

Množství tokoferolů bylo naproti tomu překvapivě vysoké. Množství δ -tokoferolu se pohybovalo v rozmezí 0,1 – 1,3 % v thoraxu a 0,4 – 5,5 % u tukového tělesa. Množství pro γ -tokoferol bylo 3 – 8,6 % u thoraxu a 9,1 – 31,3 % u tukového tělesa.

Graf 2.: Thorax



Graf 3.: Tukové těleso



Je tedy patrné, že ze sterolů byl nejhojnější sitosterol oproti nižším hodnotám kampesterolu a velice nízkým hodnotám cholesterolu. Hodnoty celkového množství v tkáních jsou tedy markantně taženy hladinou sitosterolu. U tokoferolů byl nejhojnější γ -tokoferol a jeho vysoké hodnoty ovlivňovaly nejvíce celkové množství tokoferolů ve tkáních.

Z grafu 2. a grafu 3. je vidět, že celkové steroly vykazují mírný nárůst od jara do zimy, s minimem u vzorku odebraného 20. května pro thorax i pro tukové těleso a s maximem u vzorku odebraného 30. října pro thorax a 7. prosince pro tukové těleso. U tokoferolů je vidět spíše úbytek hladin po skončení zimy s minimem u vzorku odebraného 20. června pro thorax i pro tukové těleso, tedy v nejteplejších dnech v roce a následný opětovný nárůst hladin s maximem u vzorku odebraného 30. října pro thorax a 7. prosince pro tukové těleso.

Sezónnost a statisticky průkazné kolísání hladin sterolů a tokoferolů byly prokázány ANOVou a následnými Bonferroniho testy (výsledky označené rozdílnými písmeny jsou statisticky významně odlišné).

6. Diskuze

Tato práce přináší dosud zcela chybějící informace o sezónních změnách ve složení sterolů a tokoferolů u hmyzu.

V tkáních plošnice *P. apterus* jsme zjistili nízké množství, až téměř absenci živočišného cholesterolu. Dále jsme zjistili přítomnost vysokých hladin rostlinných sterolů kampesterolu a sitosterolu a v neposlední řadě jsme zjistili přítomnost neobvykle vysoké hladiny δ -tokoferolu a γ -tokoferolu.

Z měření jsme vyvodili, že obsah hladin sterolů a vitamínu E se sezónně významně mění. U všech typů vzorků (thorax i tukové těleso, steroly i tokoferoly) jsme naměřili maximální hladiny v zimě a minima v létě. Dále pak jsme zjistili, že množství se liší v thoraxu a v tukovém tělese, zatímco pohlaví nehraje roli. V thoraxu jsme naměřili 2x až 4x méně sterolů i tokoferolů, než ve druhé tkáni.

Jelikož je velmi obtížné získávat čisté vzorky membrán, či dokonce membránových frakcí ze zvolených tkání, pracovali jsme s celými tkáněmi. Věříme ale, že prezentované výsledky představují do značné míry právě membránově lokalizované steroly a tokoferoly. Oba typy látek totiž spontánně vstupují do membránových struktur pod vlivem svých specifických vlastností (amfipatická povaha molekuly); (**Meer et al., 2008**). Ve volné formě se tyto látky prakticky nevyskytují mimo membrány. Vázané formy (například esterifikované steroly) nebyly do naší analýzy zahrnuty, neboť jsme je pomocí SPE frakcionace oddělili v jiné fázi a tedy naše výsledky neovlivňují. Je ovšem možné, že se steroly a tokoferoly nacházejí také částečně v lipidických obalech tukových kapének. Obaly tukových kapének nemají charakteristickou strukturu dvojvrstvy, ale jedná se o jednovstevné struktury (**Arrese and Soulages, 2010**). Při podzimním ukládání zásobních lipidů na zimu se markantně zvýší množství tukových kapének, které se převážně nacházejí v tukovém tělese. Toto hromadění sterolů a tokoferolů v obalech tukových kapének by mohlo ovlivňovat naše výsledky. Proto plánujeme v blízké budoucnosti připravit vzorky obsahující čisté membránové frakce a ty následně analyzovat.

Naše výsledky ukazují, že poměry relativní četnosti sterolů a tokoferolů se zvyšují během zimy. To lze vysvětlit tím, že: a) rovnoměrně, ve všech membránách a obalech tukových kapének přibývá na zimu molekul sterolu a tokolu, b) před zimou přibývá tukových kapének a ty mají vyšší poměr sterolu/PL a tokolu/PL než jiné membrány. Pro

vysvětlení b) se zdá svědčit výsledek analýz thoraxu, který neobsahuje tukové kapénky. Sezónní změny v thoraxu jsou jako by "plošší" nežli v tukovém tělese.

Protože doposud nebylo vypracováno mnoho studií týkajících se role sterolů nebo tokoferolů v membránách při chladové odolnosti u hmyzu, musíme porovnávat naše data s výsledky studií u jiných živočichů. Hmyz v našich výsledcích vykazuje velice nízké procento cholesterolu oproti vysokému množství například v membránách lidských spermií (**Drobnis et al. 1993**). U pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) dochází během chladové aklimace ke zvýšení relativního poměru cholesterolu k celkovým lipidům na bazolaterální membráně střevního epitelu (stejně jako u našich výsledků), ale naopak na vláskové (brush-border) membráně se tento poměr snižuje (**Crockett and Hazel, 1995**). U larev mouchy *E. solidaginis* dochází ke zvyšování obsahu cholesterolu v hemolymfě (**Yi and Lee, 2005**).

Pokud by naše měření skutečně reprezentovala hlavně steroly a tokoly v membránách (a obalech tukových kapének), znamenal by jejich sezónní (zimní) nárůst relativní četnosti zvyšování fluidity těchto struktur, zároveň s tím by ale klesala i teplota jejich fázového přechodu do gelové fáze (T_m); (**Crockett and Hazel, 1995**). Dále by mohl sezónní nárůst četnosti sterolů a tokolů souviset s jejich stabilizační funkcí na membránu, kdy vyrovnávají laterální tlaky zakřivení membrány způsobené relativně vyšším množstvím molekul lysofosfolipidů, a zabraňují tak v krajním případě tvorbě micel (**Atkinson et al., 2008**). Skutečně, v thorakální tkáni ruměnic bylo zjištěno relativně vysoké množství lyso-PL (až 40 molárních %); (**Berková and Košťál, nepublikované výsledky**).

Tokoferoly hrají u hmyzu roli antioxidantů (**Wang and Quinn, 1999**). Snad i proto se přes zimní měsíce zvyšuje jejich množství, když jsou membrány vystaveny vyššímu množství volných radikálů a tedy více ohroženy oxidativním poškozením. V průběhu zimní sezóny totiž dochází k relativně častým výkyvům teploty, jež jsou doprovázeny i dramatickými změnami metabolické rychlosti u ploštic. V teplých periodách se ploštice aktivně pohybují, vyhřívají se na kmenech stromů, patrně i přijímají potravu a vodu. Naopak v chladných periodách jsou ploštice v hrabance a jejich tělní teploty klesají pod nulu. Stejně tak při jarním obnovení vývoje se rozbíhají nanovo veškeré fyziologické funkce a dochází k rychlému a silnému nárůstu rychlosti dýchání s možným důsledkem nadprodukce volných radikálů kyslíku (**Košťál et al., 2011**).

7. Závěr

Zjistili jsme, že tkáně (tukové těleso, thorax) ruměnice pospolné, *P. apterus* obsahují cholesterol, sitosterol a kampesterol, dále pak to δ -tokoferol a γ -tokoferol.

Obsah cholesterolu byl v rozmezí 0,2 - 0,4 % v thoraxu a 0,5 – 0,8 % v tukovém tělese. Obsah kampesterolu byl v rozmezí 1,2 – 2,5 % v thoraxu a 1,5 – 4,6 % v tukovém tělese. Obsah sitosterolu byl v rozmezí 5,1 – 8 % pro thorax a 6,8 – 15,2 % pro tukové těleso.

Množství δ -tokoferolu se pohybovalo v rozmezí 0,1 – 1,3 % v thoraxu a 0,4 – 5,5 % u tukového tělesa. Množství pro γ -tokoferol bylo v rozmezí 3 – 8,6 % u thoraxu a 9,1 – 31,3 % u tukového tělesa.

Celkový obsah cholesterolu v tkáních *P. apterus* byl velmi nízký, oproti tomu množství tokoferolů bylo neobvykle vysoké. Pro thorax byly obecně hladiny (jak sterolů, tak tokoferolů) nižší než pro tukové těleso.

Relativní zastoupení sterolů a tokoferolů (vzhledem k celkovým fosfolipidům) vykazovalo sezónní výkyvy s minimem v letních a s maximem v zimních měsících.

Na základě našich výsledků nelze rozhodnout, zda naše měření zahrnují pouze steroly a tokoferoly lokalizované v buněčných membránách, či zda a do jaké míry jsou naše výsledky ovlivněny také přítomností sterolů a tokoferolů v obalech tukových kapének.

V blízké budoucnosti plánujeme analýzu relativní četnosti sterolů a tokoferolů přímo v membránových frakcích izolovaných z různých tkání hmyzu.

8. Literatura

Allard, J. P., Kurian, R., Aghdassi, E., Muggli, R., Royall, D. (1997): Lipid peroxidation during n-3 fatty acid and vitamin-E supplementation in humans, *Lipids* 32 (5), 535–541.

Arora, A., Raghuraman, H., Chattopadhyay, A. (2004): Influence of cholesterol and ergosterol on membrane dynamics: a fluorescence approach, *Biochemical and Biophysical Communications* 318 (4), 920 – 926.

Arrese, E. L., Soulages, J. L. (2010): Insect Fat Body: Energy, Metabolism, and Regulation, *Annual review of entomology* 55, 207 – 225.

Atkinson, J., Epand, R. F., Epand R. M. (2008): Tocopherols and tocotrienols in membranes: A critical review, *Free radical biology and medicine* 44 (5), 739 – 764.

Ba, A. S., Guo, D. A., Norton, R. A., Phillips, S. A., Nes, W. D. (1995): Developmental differences in the sterol composition of *Solenopsis invicta*, *Archives of insect biochemistry and physiology* 29 (1), 1 – 9.

Behmer, S. T., Nes, W. D. (2003): Insect sterol nutrition and physiology: A global overview, *Advances in insect physiology* 31, 1 – 72.

Bennett, V. A., Pruitt, N. L., Lee, R. E. Jr. (1997): Seasonal changes in fatty acid composition associated with cold-hardening in third instar larvae of *Eurosta solidaginis*, *Journal of comparative physiology B – biochemical systemic and environmental physiology* 167 (4), 249 – 255.

Billheimer, J. T., Tavani, D. M., Ritter, K. S. (1983): Acyl coenzyme A: Cholesterol acyltransferase activity in fat body and intestinal microsomes of *Heliothis-zea*, *Comparative biochemistry and physiology B-Biochemistry and molecular biology* 76 (1), 127 – 132.

Bitmann, R. (1997): Has nature designed the cholesterol side chain for optimal interaction with phospholipids, *Subcellular Biochemistry* 28, 145 – 171.

Brown, D. A., London, E. (1998): Functions of lipid rafts in biological membranes, *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 14, 111 – 136.

Caffrey, M. (2003): Membrane protein crystallization, *Journal of structural biology* 142 (1), 108 – 132.

Canavoso, L. E., Jouni, Z. E., Karnas, K. J., Pennington, J. E., Wells, M. A. (2001): Fat metabolism in insects, *Annual review of nutrition* 21, 23 – 46.

Ciufo, L. F., Murray, P. A., Thompson, A., Rigden, D. J., Rees, H. H. (2011): Characterisation of a Desmosterol Reductase Involved in Phytosterol Dealkylation in the Silkworm *Bombyx mor*, *Plus One* 6 (6).

Crockett, E. L., Hazel, J. R. (1995): Cholesterol levels explain inverse compensation of membrane order in brush-border but not homeoviscous adaptation in basolateral membranes from the intestinal epithelia of rainbow-trout, *Journal of experimental biology* 198 (5), 1105 – 1113.

Danielsson, H., Sjövall, J. (eds.); (1985): *Sterols and Bile Acids*, *New comparative Biochemistry* vol. 12, Amsterdam: Elsevier Science Publishers B. V., 31, 189 – 196, 210 – 219.

Danks, H. V. (1987): *Insect dormancy: An ecological perspective*, Ottawa: Biological Survey of Canada (Terrestrial Arthropods).

Denlinger, D. L., Lee, R. E. Jr. (eds.); (2010): *Low temperature biology of insects*, New York: Cambridge University Press, 116-140.

Dowhan, W. (1997): Molecular basis for membrane phospholipid diversity: Why are there so many lipids?, *Annual review of biochemistry* 66, 199 – 232.

Downer, R. G. H. (1978): Functional role of lipids on insect, *Biochemistry of Insect*, 57 – 92.

Drobnis, E. Z., Crowe, L. M., Berger, T., Anchordoguy, T. J., Overstreet, J. W., Crowe, J. H. (1993): Cold shock damage is due to lipid phase – transition in cell – membranes – a demonstration using sperm as a model, *Journal of experimental zoology* 256 (4), 432 – 437.

Dwivedy, A. K. (1993): A preferential uptake of cholesterol by the brain tissue of the housefly, *Musca domestica* L, *Experientia* 39 (3), 272 – 273.

Edidin, M. (2003): The state of lipid rafts: From model membranes to cells, *Annual review of biophysics and biomolecular structure* 32, 257 – 283.

Epand, R. M. (1998): Lipid polymorphism and protein-lipid interactions, *Biochimica et biophysica acta-reviews on biomembranes* 1376 (3), 353–368.

Erin, A. N., Gorbunov, N. V., Brusovanik, V. I., Tyurin, V. A., Prilipko, L. L. (1986): Stabilization of synaptic membranes by alpha-tocopherol against the damaging action of phospholipases - Possible mechanism of biological action of vitamin E, *Brain research* 398 (1), 85 – 90.

Florkin, M., Stotz, E. H. (eds.); (1963): Sterols, bile acids and steroids, Comprehensive Biochemistry vol. 10, Amsterdam, London, New York: Elsevier Publishing Company, 6 – 21.

Folch, J., Lees, M., Stanley, G. H. S. (1957): A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues, Journal of Biological Chemistry 226 (1), 497-509.

Fukuzawa, K., Ikebata, W., Shibata, A., Sakanaka, T., Urano, S. (1993): Location of alpha-tocopherol in phospholipid vesicles and its dynamics in inhibiting lipid peroxidation, In: Mino, M., Nakamura, H., Diplock, A. T., Kayden, H. J. (eds.): Vitamin E: its usefulness in health and in curing diseases, Japan Scientific Soc Press, Tokyo, 31–40.

Gilbert, L. I., Rybcznski, R., Warren, J. T. (2002): Control and biochemical nature of the ecdysteroidogenic pathway, Annual review of entomology 47, 883 – 916.

Goot, van der F. G., Harder, T. (2001): Raft membrane domains: from a liquid-ordered membrane phase to a site of pathogen attack, Seminars in Immunology 13 (2), 89 – 97.

Harwood, J. L., Jones, A. L., Perry, H. J., Rutter, A. J., Smith, K. L., Williams, M. (1994): Changes in plant lipids during temperature adaptation, In: Cossins, A. R. (ed.): Temperature adaptation of biological membranes, Portland Press, London, 107 – 118.

Hazel, J. R. (1995): Thermal adaptation in biological membranes: is homeoviscous adaptation the explanation, Annual review of physiology 57, 19 – 42.

Henry, H. L. (2011): Regulation of vitamin D metabolism, Best practice and research clinical endocrinology and metabolism 25 (4), 531 – 541.

Hodková, M., Berková, P., Zahradníčková, H. (2002): Photoperiodic regulation of the phospholipid molecular species composition in thoracic muscles and fat body of *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera) via an endocrine gland, corpus allatum, Journal of insect physiology 48 (11), 1009–1019.

Huang, CH., Lin, H. N., Li, S. S., Wang, G. Q. (1997): Influence of the positions of cis double bonds in the sn-2-acyl chain of phosphatidylethanolamine on the bilayer's melting behavior, Journal of biological chemistry 272 (35), 21917 – 21926.

Chapman, D. (1975): Phase and fluidity characteristics of lipid and cell membranes, Quarterly review of biophysics 8 (2), 185 – 235.

Ito, N., Ohtsubo, T., Kusu, F., Hakamata, H. (2011): An ultra performance liquid chromatographic method for determining phytosterol uptake by Caci-2 cells, *Analytical Biochemistry* 421 (1), 86 – 91.

Janes, N. (1996): Curvature stress and polymorphism in membranes, *Chemistry and physics of lipids* 81 (2), 133–150.

Joshi, M., Agarwal, H. C. (1977): Site of cholesterol absorption in some insects, *Journal of insect physiology* 23 (3), 403 – 404.

Kagan, V. E., Bakalova, R. A., Zhelev, Z. Z., Rangelova, D. S., Serbinova, E. A., Tyurin, V. A., Denisova, N. K., Packer, L. (1990): Intermembrane transfer and antioxidant action of alpha-tocopherol in liposomes, *Archives biochemistry and biophysics* 280 (1), 147 – 152.

Kalač, P. (2001): *Organická chemie přírodních látek a kontaminantů*, České Budějovice, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.

Kirk, G. L., Gruner, S. M., Stein, D. L. (1984): A thermodynamic model of the lamellar to inverse hexagonal phase-transition of lipid-membrane water-system, *Biochemistry* 23 (6), 1093 – 1102.

Kodíček, M.: *Biochemické pojmy: výkladový slovník* [online]. 1. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2004, 171 s. [cit. 2012-12-08]. ISBN 80-708-0551-X. Dostupné z WWW: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002_v1/motor/main.obsah.html>

Kogure, K., Nakashima, S., Tsuchie, A., Tokumura, A., Fukuzawa, K. (2003): Temporary membrane distortion of vascular smooth muscle cells ism responsible for their apoptosis induced by platelet-activating factor-like oxidized phospholipids and their degradation product, lysophosphatidylcholine, *Chemistry and physics of lipids* 126 (1), 29 – 38.

Košťál, V., Berková, P., Šimek, P. (2003): Remodelling of membrane phospholipids during transition to diapause and cold-acclimation in the larvae of *Chymomyza costata* (Drosophilidae), *Comparative biochemistry and physiology part B* 135 (3), 407 – 419.

Košťál, V. (2006): Eco-physiological phases of insect diapause, *Journal of insect physiology* 52 (2), 113 – 127.

Košťál, V., Renault, D., Rozsypal, J. (2011): Seasonal changes of free amino acids and thermal hysteresis in overwintering heteropteran insect *Pyrrhocoris apterus*,

Comparative biochemistry and physiology A-molecular & integrative physiology 160 (2), 245 – 251.

Krebs, K. C., Lan, Q. (2003): Isolation and expression of a sterol carrier protein-2 gene from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, *Insect Molecular Biology* 12 (1), 51 – 60.

Lasser, N. L., Edwards, A. M., Clayton, R. B. (1966): Distribution and dynamic state of sterols and steroids in the tissues of an insect, the roach *Eurycotis floridana*, *Journal of lipid research* 7 (3), 403 – 411.

Lee, R. E. Jr., Denlinger, D. L. (eds.); (1991): *Insects at Low Temperature*, New York, London: Chapman and Hall.

Lee, A. G. (2004): How lipids affect the activities of integral membrane proteins, *Biochimica et biophysica acta-biomembranes* 1666 (1 - 2), 62 – 87.

Liebler, D. C. (1993): The role of metabolism in the antioxidant function of vitamin-E, *Critical reviews in toxicology* 23 (2), 147 – 169.

Meer van, G., Voelker, D. R., Feigenson, G. W. (2008): Membrane lipids: where they are and how they behave, *Nature reviews molecular cell biology* (9) 2, 112 – 124.

Murata, N. (1994): Genetic and temperature-induced modulation of cyanobacterial membrane lipids, In: Cossins, A. R. (ed.): *Temperature adaptations of biological membranes*, Portland Press, London, 155–162.

Nes, W. R. (1974): Role of sterols in membranes, *Lipids* 9 (8), 596 – 612.

Nes, W. R., Sekula, B. C., Nes, W. D., Adler, J. H. (1978): The functional importance of structural features of ergosterol in yeast, *Journal of biological chemistry* 253 (17), 6218 – 6225.

Pavlík, M., Ryšavá, H., Wimmer, Z. (2010): Metabolismus Ekdysteroidů u Hmyzu (*Insecta*) a význam hmyzí střevní mikroflory, *Chemické listy* 104, 831 – 837.

Pennock, J. F., Hemming, F. W., Kerr, J. D. (1964): Reassessment of tocoferol chemistry, *Biological and biophysical research communication* 17 (5), 542 - 9.

Rietveld, A., Neutz, S., Simons, K., Eaton, S. (1999): Association of sterol and glycolphosphatidylinositol-linked proteins with *Drosophila* raft lipid microdomains, *Journal of Biological Chemistry* 274 (17), 12049 – 12054.

Sall, C., Tsoupras, G., Kappler, C., Lagueux, M., Zachary, D., Luu, B., Hoffman, J. A. (1983): Fate of maternal conjugated ecdysteroids during embryonic development in *Locusta migratoria*, *Journal of insect physiology* 29 (6), 491 – 507.

Short, J. D., Guo, D-A., Svoboda, J. A., Nes, W. D. (1996): Mechanistic and metabolic studies of sterol 24, 25-double reduction in *Manduca sexta*, *Archives of insect biochemistry and physiology* 31 (1), 1–22.

Shreve, S. M., Kelty, J. D., Lee, R. E. Jr. (2004): Preservation of reproductive behaviors during modet cooling: rapid cold-hardening fine-tunes organismal response, *Journal of experimental biology* 207 (11), 1797 – 1802.

Sinensky, M. (1974): Homeoviscous adaptation - homeostatic process that regulates viscosity of membrane lipids in *Escherichia-coli*, *Proceedings of the National academy of sciences of the United states of America* 71 (2), 522 – 525.

Spector, A. A., Yorek, M. A. (1985): Membrane lipid-composition and cellular function, *Journal of lipid research* 26 (9), 1015 – 1035.

Suzuki, Y. J., Tsuchiya, M., Wassall, S. R., Choo, Y. M., Govil, G., Kagan, V. E., Packer, L. (1993): Structural and dynamic membrane properties of alpha-tocopherol and alpha-tocotrienol: implication to the molecular mechanism of their antioxidant potency, *Biochemistry* 32 (40), 10692 – 10699.

Svoboda, J. A. (1994): Steroid metabolism as a target for insect control, *Biochemical society transactions* 22 (3), 635 – 641.

Šlachta, M. (2003): Význam diapauzy pro chladovou odolnost ploštic *Pyrrhocoris apterus* (L.) a *Graphosoma lineatum* (L.) v předzimním období, Diplomová práce, České Budějovice, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 69 str.

Tollarová, M. (2005): Biochemické adaptace pro přežití podnulových teplot u ploštic *Pyrrhocoris apterus* (Insecta: Heteroptera), Diplomová práce, České Budějovice, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 39 str.

Tomčala, A., Tollarová, M., Overgaard, J., Simek, P., Košťál, V. (2006): Seasonal acquisition of chill tolerance and restructuring of membrane glycerophospholipids in an overwintering insect: triggering by low temperature, desiccation and diapause progression, *Journal of experimental biology* 209 (20), 4102 – 4114.

Traber, M. G. (1994): Determinants of plasma vitamin-E concentrations, *Free radical biology and medicine* 16 (2), 229 – 239.

Turunen, S., Chippendale, G. M. (1977): Lipid absorption and transport – sectional analysis of larval midgut of corn-borer, *diatraea-grandiosella*, *Insect biochemistry* 7 (3), 203 – 208.

Turunen, S., Crailsheim, K. (1996): Lipid and sugar absorption, In: Lehane, M. J., Billingsley, P. F. (eds.): *Biology of the Insect Midgut*, Chapman and Hall, London, 291–320.

Urban, T. (2010): Analýza mastných kyselin v diglyceridech a triglyceridech z hemolymfy a tkání hmyzu pomocí plynové chromatografie, Bakalářská práce, České Budějovice, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 35 str.

Vance, D. E. (2000): Cholesterol in the year 2000, *Biochimica et biophysica acta-molecular and cell biology of lipids* 1529 (1-3), 1 – 8.

Vist M. R., Davis, J. H. (1990): Phase equilibria of cholesterol/dipalmitoylphosphatidylcholine mixtures: ²H nuclear magnetic resonance and differential scanning calorimetry, *Biochemistry* 29 (2), 451 – 464.

Wang, G. Q., Li, S. S., Lin, H. N., Brumbaugh, E. E., Huang CH. (1999): Effects of various numbers and positions of cis double bonds in the sn-2 acyl chain of phosphatidylethanolamine on the chain-melting temperature, *Journal of biological chemistry* 274 (18), 12289 – 12299.

Wang, X. Y., Quinn, P. J. (1999): Vitamin E and its function in membranes, *progress in lipid research* 38 (4), 309 – 336.

Whittle, K. J., Dunphy, P. J., Pennock, J. F. (1966): Isolation and properties of delta-tocopherol from hevea latex, *Biochemical journal* 100 (1), 138 – 143.

Yi, S. X., Lee, R. E. Jr. (2005): Changes in gut and Malpighian tubule transport during seasonal acclimatization and freezing in the gall fly *Eurosta solidaginis*, *Journal of experimental biology* 208 (10), 1895 – 1904.

Zicha, O.: BioLib: Biological Library [online]. © 1999 – 2011 [cit. 2012-12-08]. Dostupné z WWW: <www.biolib.cz/en/image/id32032/>.

9. Seznam použitých zkratek

ACAT – acyl transferase
AFPs – antifreeze proteins
DAG – diacylglycerol
DHA – docosahexaenoic acid
DSC – differential scanning calorimetry
FA – fatty acid
GC/MS – gas chromatography-mass spectrometry
GPC – glycerophosphocholine
GPE – glycerophosphoethanolamin
GPL – glycerophospholipid
HDLp – high density lipophorin
HPLC-MS – high performance liquid chromatography mass spectrometry
HVA – homeo-viscous adaptation
LDLp – low density lipophorin
LPC – lysophosphatidylcholine
PC – phosphocholine
PE – phosphoethanolamin
PL – phospholipids
RC – rapid cooling
S – sterols
SCP – super cooling point
SE – sterolesters
SPE – solid phase extraction
TAG – triacylglycerol
TG – triglyceride
VHDLp – very high density lipophorin