

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor SOČ: 04. Biologie

Hormonální kontrola trávení u švába amerického *Periplaneta americana*

Karolina Bodláková

Kraj: Jihočeský

České Budějovice 2017

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor SOČ: 04. Biologie

Hormonální kontrola trávení u švába amerického *Periplaneta americana*

Autor: Karolina Bodláková

Škola: Gymnázium, České Budějovice, Česká 64, 370 21

Vedoucí práce: prof. RNDr. Dalibor Kodrík, CSc., ENTÚ AV ČR

Konzultant: RNDr. Pavla Kodríková, Gymnázium, Česká 64

Kraj: Jihočeský

České Budějovice 2017

Práce byla vyhotovena na Entomologickém ústavu Biologického centra Akademie věd České republiky, v. v. i. (ENTÚ BC AV ČR), Branišovská 31, České Budějovice, 370 05.

Práce byla podpořena projektem Otevřená věda IV – CZ.1.07/2.3.00/45.0041 – 1.010 Enzymatická aktivita hmyzího střeva a její hormonální kontrola, Středisko společných činností Akademie věd České republiky, Praha. Práce byla částečně financována projektem České grantové agentury č. 14-07172S (DK)

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracovala samostatně a použila jsem pouze podklady (literaturu, projekty, SW atd.) uvedené v seznamu vloženém v práci SOČ.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupňování této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) v platném znění.

V dne

podpis.....

Poděkování

Děkuji všem, kteří přispěli ke vzniku této práce, především pak panu prof. RNDr. Daliboru Kodříkovi CSc., za celkové seznámení s problematikou, velkou pomoc a poskytnutí zázemí i materiálu k uskutečňování pokusů. Velký dík patří také celému kolektivu laboratoře Fyziologie hmyzu ENTÚ za poskytovanou praktickou pomoc ve všech ohledech a příjemné chvíle strávené v laboratoři. Dále děkuji RNDr. Pavle Kodříkové za projevovanou psychickou i praktickou pomoc, která mě nesmírně motivovala a velmi mi pomohla. V neposlední řadě vyslovuji dík svým učitelům, kteří tolerovali mou zaneprázdněnost a tím mi umožnili zajímavé cesty za poznáváním entomologie. Ale také všem ostatním, kteří se mi snažili jakkoliv pomoc.

Anotace

Předkládaná práce se zabývá charakterizací trávicích enzymů (amyláz, lipáz, proteáz) ze středního střeva (mesenteron) a slepých výběžků (caeca) švába amerického *Periplaneta americana* a dále řízením jejich aktivity adipokinetickými hormony označenými jako Peram-CAH-I a -II. Pokusy byly prováděny na dospělých jedincích švába pocházejících z laboratorního chovu Entomologického ústavu BC AVČR v Českých Budějovicích. Zmíněné adipokinetické hormony jsou jednoduché peptidy skládající se z osmi aminokyselin a jejich hlavní funkcí je mobilizace energetických zásob ve stresových situacích a eliminace nebo snížení dopadu stresu na hmyzí organismus. Zajišťují však řadu dalších biochemických a fyziologických funkcí, které anti-stresovou reakci doplňují, včetně stimulace trávení. Testované hormony byly vpraveny do těla švába buď injekčně (in vivo test) nebo přidávány do média s inkubovaným střevem (in vitro test). Po 24 hodinách působení byly enzymy ze střev extrahovány a za daných podmínek testována jejich aktivita. Výsledky ukázaly, že k trávení všech živin docházelo v obou částech středního střeva – caecách i vlastním střevě, ale cukry se přednostně trávily v caecách a lipidy přednostně ve střevě. Adipokinetické hormony ovlivňovaly aktivitu enzymů selektivně – na každý enzym působily rozdílně. Po aplikaci hormonů se aktivita amyláz zvyšovala ve středním střevě více než v caecách, aktivita proteáz se zvyšovala pouze ve středním střevě a aktivita lipáz se zvyšovala ve středním střevě i caecách. Mezi oběma hormony nebyly zjištěny podstatné rozdíly. Stimulační aktivity hormonů při in vitro testech naznačila přímé hormonální řízení enzymatické aktivity.

Klíčová slova: Enzym; amyláza; proteáza; lipáza; adipokinetický hormon; střevo; caeca; šváb americký *Periplaneta americana*

Annotation

The present study deals with characterization of digestive enzymes (amylases, proteases, lipases) from the mesenteron (midgut and caeca) of the American cockroach *Periplaneta americana*, and further describes a control of their activity by adipokinetic hormones (AKHs) designated as Peram-CAH-I and –II. The experiments were done using the adult males of the American cockroach from a laboratory colony kept in the Insectary of the Institute of Entomology BC CAS in České Budějovice. The AKHs are simple octapeptides and their main function in the insect body is a mobilization of energy rich metabolites under stress situations, and thus elimination or reduction of impact of the stress on insect organism. Additionally, the AKHs control several biochemical and physiological processes that accompany the main anti-stress reaction, including a digestion. The hormones were applied into the cockroach body by injection (in vivo test) or added into the medium (in vitro test), in which the midgut and caeca were incubated for 24 hours. After that the enzymes were extracted from the organs and their activity was tested. The results showed that all nutrients were digested in both parts of the gut - both midgut and caeca, however, carbohydrates were preferentially digested in caeca, and lipids in midgut. The AKHs affected enzymes selectively: after their application amylase activity increased in midgut more than in caeca, protease activity increased only in midgut and lipase activity increased in both part of the gut equally. No substantial differences between both tested hormones were found. The results suggest a direct stimulatory effect of AKHs on the activity of tested enzymes in the American cockroach gut.

Key words: Enzyme; amylase; protease; lipase; adipokinetic hormone; midgut; caeca
American cockroach *Periplaneta Americana*

Obsah

1. ÚVOD	9
1.1. Hormony.....	9
1.1.1. Definice a rozdělení hormonů	9
1.1.2. Funkce hormonů.....	10
1.1.3. Chemické složení hormonů	10
1.1.4. Syntéza a transport hormonů	11
1.1.5. Mechanismus působení hormonů	11
1.1.6. Hierarchie hormonálního řízení.....	12
1.2. Hmyzí hormony.....	13
1.2.1. Hormonální soustava bezobratlých	13
1.2.2. Hormonální soustava hmyzu	13
1.2.3. Základní skupiny hmyzích hormonů	14
1.2.4. Adipokinetické hormony	15
1.3. Šváb americký (<i>Periplaneta americana</i>).....	16
1.3.1. Obecné informace.....	16
1.3.2. Morfologie.....	17
1.3.3. Anatomie a fyziologie	18
1.4. Enzymy.....	20
1.4.1. Obecné informace.....	20
1.4.2. Stavba enzymů	20
1.4.3. Klasifikace a názvosloví enzymů	20
1.4.4. Význam enzymů v organismu	22
1.4.5. Amylázy	23
1.4.6. Proteázy	23
1.4.7. Lipázy	24
2. CÍLE PRÁCE	24
3. MATERIÁL A METODIKA	25
3.1. Chov švába amerického.....	25
3.2. Aplikace adipokinetických hormon.....	25
3.3. Pitva švába amerického	25
3.4. Extrakce enzymů ze středního střeva a caeca.....	26
3.5. Stanovení amylázové aktivity pomocí rozpustného škrobu	27
3.6. Stanovení proteázové aktivity pomocí resorufin-kaseinu	28
3.7. Stanovení lipázové aktivity kinetickou fluorescencí	29
3.8. Příprava grafů a statistické zpracování.....	29

4. VÝSLEDKY	30
5. DISKUZE.....	42
6. ZÁVĚR.....	46
7. LITERATURA.....	47

1. ÚVOD

1.1. Hormony

1.1.1. Definice a rozdělení hormonů

Hormony jsou produkovány endokrinními žlázami. Jsou výkonnými jednotkami endokrinní soustavy, která je jednou z řídicích soustav, které udržují činnost a homeostázu organismu. Endokrinní soustava bývá označována také jako humorální soustava, protože pracuje s chemickými látkami – hormony – jako posly. Tato soustava je propojena s nervovou soustavou a tvoří spolu integrovaný funkční systém. Mezi oběma soustavami jsou ale značné rozdíly. Nervová soustava je rychlá, pružná, cílená, má krátkodobou regulaci a komunikace mezi buňkami je zajištěna pomocí elektrických signálů. Oproti tomu humorální soustava má pomalou a dlouhodobou regulaci, cílenost je zajištěna specifickými receptory a ke komunikaci mezi buňkami slouží specifické látky - hormony.

Hormony jsou tedy chemické látky, které řídí řadu důležitých životních procesů tím, že předávají informace mezi buňkami. Vylučují se do krve (někdy probíhá šíření jen difúzí) a odtud se poté šíří ke všem buňkám v těle. Působí ale jen na ty buňky, které jsou schopny na hormonální signál zareagovat pomocí receptorů.

Hormony můžeme rozdělit podle různých kritérií do několika typů. Podle místa produkce je dělíme na:

1. Klasické, systémové, efektorové, „pravé hormony“ - jsou produkovány endokrinními žlázami.
2. Neurohormony – jsou produkovány specializovanými buňkami nervové soustavy.
3. Tkáňové hormony - tvoří je skupiny buněk řady orgánů.

Dalším způsobem, kterým můžeme hormony rozdělit, je podle účinku působení, konkrétně na:

1. Regulační neboli tropní hormony, které mají účinek na jiné endokrinní žlázy. Jsou to tedy řídicí hormony.
2. Hormony s přímým účinkem, které působí přímo na daný orgán nebo tkáň – vlastní výkonné hormony.
3. Hormony produkované buňkami tkání přímo řídící nějaký proces (například gastrin, který je vylučovaný žaludeční sliznicí, řídí sekreci žaludečních šťáv).

Z hlediska způsobu šíření hormonů mluvíme o několika typech regulace:

1. Autokrinní regulace, kdy produkovaný hormon působí přímo na buňku, ve které vznikal.
2. Parakrinní regulace, při níž nejsou hormony přenášeny krví, ale šíří se pouze difúzí do blízkého okolí buňky, ve které se syntetizovaly.
3. Endokrinní regulace, kdy buňky syntetizují hormony a ty jsou pak roznášeny pomocí krve do těla.
4. Neuroendokrinní regulace, při které jsou hormony z nervových buněk přenášeny axonem do krve a tou poté transportovány po těle.
5. Exokrinní regulace, která zahrnuje hormony/látky vylučované mimo tělo, které zpravidla slouží k navázání kontaktu mezi jedinci stejného druhu – jedná se o feromony, které ovlivňují například chování spojené s příjmem potravy a vody, vábením, rozmnožováním atd.

1.1.2. Funkce hormonů

Hormony mají řadu důležitých životních funkcí. Podílí se na řízení základních fyziologických procesů, jako je metabolismus živin a správné hospodaření s vodou a ionty, růst, vývoj, srdeční činnost, trávicí činnost, chování, fyziologické a jiné rytmy, barvoměna nebo rozmnožování.

Všeobecně se hormony spojují s ovlivněním chemickým procesů ve svých cílových buňkách, kde především spouští syntézu nebo řídí aktivitu zde přítomných enzymů.

Tkáňové hormony, kterých je v živočišném organismu velké množství pak ovlivňují desítky konkrétních procesů v jednotlivých orgánech – např. příjem potravy, trávicí činnost, produkci trávicích enzymů, průběh zánětu a alergické reakce, činnost svalového vlákna atd..

1.1.3. Chemické složení hormonů

Podle chemického složení můžeme hormony rozdělit do 4 základních skupin:

1. Peptidické látky (peptidy, proteiny, glykoproteiny) - jsou to sekretorické proteiny, které se tvoří v drsném endoplazmatickém retikulu, odkud jsou předány do Golgiho aparátu. Dále se přesunují k povrchu buňky, kde se exocytózou uvolňují mimo ni. U obratlovců sem patří hormony hypotalamu, hypofýzy, placenty, slinivky břišní a další. U hmyzu např. adipokinetické hormony (viz níže).
2. Steroidní látky, které jsou zpravidla odvozené od cholesterolu. Řadíme sem hormony kůry nadledvin a pohlavních žláz. U hmyzu se pak tvoří steroidní

hormony – ekdysteroidy – u býložravých druhů hmyzu jsou jejich prekurzory rostlinné steroidy, u masožravých druhů pak cholesterol.

3. Deriváty aminokyselin (často aminy), kam patří hormony štítné žlázy (tyroxin), dřeně nadledvin (adrenalin a noradrenalin) a epifýzy (melatonin).
4. Deriváty mastných kyselin jako například eikosanoidy.

1.1.4. Syntéza a transport hormonů

Sekreci hormonů ovlivňují dva základní fyziologické procesy, konkrétně syntéza hormonů a jejich výdej do krve. V krátkodobém měřítku může výdej do krve přesahovat syntézu, ale pouze do doby, než se vyčerpají nasyntetizované zásoby.

Syntézu hormonů katalyzují enzymy a uskutečňuje se zpravidla přes velký počet mezistupňů. U řady hormonů je syntetická dráha prozkoumána a popsána. Např. u peptidických hormonů se daný hormonální gen prvně přepíše do tzv. preprohormonu. Jedná se o peptidovou molekulu, která reprezentuje úplně přepsaný gen společně se signálním peptidem před posttranslační úpravou. Během ní se z hormonu enzymaticky odštěpuje signální peptid a vzniká tak prohormon, který již obsahuje vlastní hormon plus další peptidové sekvence. Vlastní aktivní hormon se tvoří v Golgiho aparátu před vyprodukováním do extracelulárních prostor .

Nejčastějším způsobem přenosu hormonů je transport pomocí krevního oběhu. Častým jevem je tvorba komplexů hormonů s bílkoviny, které jim zajišťují ochranu před enzymatickou degradací nebo před vyloučením v ledvinách. Existují ale i hormony, které se přenášejí samostatně rozpuštěné v krevní plazmě. Jiné hormony, nejčastěji se jedná o tkáňové hormony, používají ke svému pohybu na krátké vzdálenosti difúzi.

1.1.5. Mechanismus působení hormonů

Mechanismus působení hormonů spočívá v ovlivnění několika aspektů. Prvním z nich je aktivace již existujících enzymů, kdy signální hormonální dráha převede neaktivní formy enzymů na aktivní. Tyto biokatalyzátory pak řídí specifické reakce v buňce a přebírají tak výkonnou roli daného hormonu. Dalším hormonálním mechanismem je zajištění exprese nebo naopak potlačení exprese genu daného enzymu, čímž hormony startují nebo naopak pozastavují tvorbu tohoto enzymu. Dalším aspektem je potom ovlivnění dostupnosti substrátu pro enzymatické reakce, což lze zajistit změnou permeability membrány. V neposlední řadě lze mechanismus působení hormonů ovlivnit změnou propustnosti membrány pro vápenaté ionty.

Hormony pak můžeme podle jejich vlastností a mechanismu působení rozdělit v zásadě do dvou velkých skupin, konkrétně na lipofilní hormony a hydrofilní hormony.

1.1.5.1. Lipofilní hormony

Jedná se o hormony, které jsou díky svým vlastnostem rozpustné v tucích (hlavně steroidní hormony) a snadno tak pronikají membránou dovnitř buňky. Uvnitř ní pak reagují s hormonálními receptory - jedná se o specifické bílkoviny, které tvoří s hormony komplex. Zmíněný komplex pak přechází do jádra buňky a reakcí s kyselou částí chromatinu dojde k disociaci na podjednotky. Jedna z nich se naváže na DNA a vytvoří místo pro navázání RNA-polymerázy, čímž dojde k transkripci genu daného enzymu a vzniklá mRNA přechází do cytoplazmy, kde se enzym syntetizuje.

1.1.5.2. Hydrofilní hormony

Do této skupiny řadíme hlavně bílkovinné nebo peptidické hormony, které kvůli svým vlastnostem nemohou proniknout přes membránu a potřebují specifické membránové receptory, které spouští reakce uvnitř buňky pomocí tzv. druhého posla. Celá hormonální kaskáda vede k aktivaci již nasyntetizovaných enzymů nebo k syntéze enzymů nových. Většina těchto receptorů je spojena s G-proteiny. Když se hormon naváže na receptor, podstupuje G-protein konformační změnu. Všechny G-proteiny jsou tvořeny třemi podjednotkami – α , β a γ . Po aktivaci hormonem dojde k rozdělení na jednotku α a společnou jednotku $\beta+\gamma$. Tyto jednotky pak prostřednictvím enzymů adenylát cyklázy nebo fosfolipázy C vyvolají tvorbu druhých poslů (cAMP, inositoltrifosfát, diacylglycerol), které následně spustí proteinkinázovou kaskádu vedoucí k aktivaci neaktivních forem enzymů; alternativně však mohou druhé posly (cAMP) iniciovat také syntézu nových enzymů jako je tomu u lipofilních hormonů.

1.1.6. Hierarchie hormonálního řízení

Mezi hormony můžeme najít hierarchii, ve které se vyskytují výše a níže postavené skupiny hormonů, které na sebe mají vzájemný účinek. U obratlovců je nejvýše postavenou strukturou hypotalamo-hypofyzární komplex, který je považován za „ředitelství“ endokrinní soustavy. U hmyzu je tento nejvýše postavený komplex tvořen soustavou mozek-corpora cardiaca-corpora allata (viz níže). Tyto nadřazené soustavy vylučují řídicí hormony, které koordinují vylučování hormonů níže postavených. Konečný hormon následně působí na cílovou buňku a řídí aktivitu jejích enzymů, jak bylo zmíněno výše. Hormonální kaskády zajišťují tzv. ampfikaci, tj. je zesílení hormonálního signálu – v každém kroku takové kaskády se signál až

několikanásobně zvyšuje, takže jedna molekula hormonu na začátku kaskády může vyvolat změnu u tisíců až desetitisíců molekul na jejím konci.

1.2. Hmyzí hormony

1.2.1. Hormonální soustava bezobratlých

Mezi hormonálními soustavami obratlovců a bezobratlých se nachází řada rozdílných, ale také shodných rysů. Obě soustavy obsahují velké množství peptidických hormonů, u hmyzu se jedná o neurohormony, oproti tomu u obratlovců mluvíme o pravých hormonech. U obou skupin pak můžeme najít také shodné hormony, jako jsou například katecholaminy nebo inzulín. Často se můžeme setkat s tím, že ke studiu savčích hormonů se využívají hmyzí modely. Kromě toho mají hormony obou skupin stejné základní stavební jednotky, jako jsou aminokyseliny, peptidy, bílkoviny, steroidy a terpenoidy.

Samozřejmě se v těchto soustavách nacházejí i rozdíly. Za ten nejpodstatnější lze považovat rozdíl v počtu pravých hormonů a neurohormonů: u bezobratlých se nachází velké množství neurohormonů a málo pravých hormonů, zatímco u obratlovců najdeme prakticky pouze 2 neurohormony (vasopresin a oxytocin) a převládají zde hormony pravé.

U většiny bezobratlých živočichů jsou hormony málo prozkoumány, existují ale skupiny, u kterých je známo poměrně velké množství informací, konkrétně u korýšů a hmyzu.

1.2.2. Hormonální soustava hmyzu

Hormonální soustava hmyzu je jedna z nejlépe prozkoumaných hormonálních soustav bezobratlých. Existují zde dvě základní soustavy a několik dalších skupin buněk, které mají endokrinní funkci.

První soustava je označována jako mozek+CC+CA, kam řadíme neurosekretické buňky mozku a párové žlázy corpora cardiaca (CC) a corpora allata (CA). Někdy bývá tato soustava srovnávána s hypotalamo-hypofyzární soustavou. Jde o hlavní řídicí systém hmyzu, který vylučuje jak vlastní neurohormony (například adipokinetické hormony), tak také řídící neurohormony i hormony pravé (juvenilní hormony). Neurosekretické buňky jsou uzpůsobeny k sekreční činnosti. V mozku se v každé hemisféře vyskytují dvě skupiny neurosekretorických buněk, jedna je umístěna v pars intercerebralis, pak hovoříme o mediálních buňkách, druhá je pak variabilní, ale její výskyt je spíše laterální (pars lateralis). Produkované neurohormony řídí buď přímo efektorový orgán (působení adipokinetických hormonů) nebo ovlivňují další endokrinní žlázy, které následně produkují hormony. Další částí této soustavy jsou pak corpora cardiaca, která jsou umístěna v blízkosti mozku a velmi

často nasedají přímo na aortu. Ústí sem zakončení axonů neurosekretorických buněk mozku a proto bývají často označovány jako neurohemální orgán. Jsou zde vylučovány jak hormony pravé, tak i neuropeptidy. Poslední žlázou této skupiny jsou corpora allata, která jsou párová, ale u některých druhů mohou splývat v jeden orgán (corpus allatum). Corpora allata se nachází v oblasti hltanu, jsou ektodermálního původu, typický je pro ně oválný či vejčitý tvar. Dochází zde k produkci juvenilních hormonů. Velikost je velmi často ovlivněna věkem, velikostí aorty, pohlavím, ale i aktivitou tohoto orgánu.

Druhou, a poslední soustavou jsou prothorakální žlázy, jedná se o párové orgány nepravidelného tvaru. Tyto orgány se nacházejí v prothoraxu (prvním hrudním článku) a zajišťují produkci steroidních hormonů - ekdysteroidů. Prothorakální žlázy bývají většinou nervově propojeny s ganglii, ale výjimečně i s mozkem (šváb). Existence těchto žláz závisí na přítomnosti juvenilních hormonů, u imag jsou například redukovány.

Mezi skupiny buněk s endokrinní funkcí pak řadíme neurosekretické buňky dalších ganglií, které produkují řadu dalších neurohormonů. Dále pak endokrinní buňky střeva, které se podílejí na vylučování peptidů často s neznámou funkcí, s největší pravděpodobností se podílí na procesech trávení. Další skupinou buněk jsou epittracheální buňky, které jsou umístěny na vzdušnici v blízkosti spirakula a produkují hormony, které se podílí na ekdyzi tj. svlékání kutikuly. Poslední skupinu pak tvoří gonády, které zajišťují produkci hormonů ovlivňujících pohlavní funkce.

1.2.3. Základní skupiny hmyzích hormonů

1.2.3.1. Ekdysteroidy

Skupina ekdysteroidů bývá často označována jako svlékací hormony. Základním hormonem této skupiny je ekdyson, který je odvozený od cholesterolu. Jedná se o prohormon pro 20-hydroxyekdyson, který vzniká z ekdysonu až v cílových tkáních. Jeho syntéza probíhá v prothorakálních žlázách, ale i v dalších tkáních jako jsou gonády nebo epidermis. Jelikož se jedná o steroidní hormon, ovlivňuje děje na úrovni DNA, kde především zajišťuje expresi genů a tedy syntézu nových enzymů. Tato skupina hormonů řídí především ekdyzi (svlékání), metamorfózu a u dospělců pak také děje při rozmnožování, kde jsou zdrojem pro ekdysteroidy hlavně gonády.

Mimo ekdysonu existuje řada dalších zoo- i fytoekdysteroidů, ne všechny jsou ale aktivní.

1.2.3.2. Juvenilní hormony

Skupina juvenilních hormonů je odvozena od kyseliny farnesilové a mají terpenoidní charakter. Na základní molekulovou kostru se připojují 3 radikály, jejich složení ovlivňuje typ juvenilního hormonu. Juvenilní hormony jsou produkovány ve žláze corpora allata, odkud je jejich uvolňování následně řízeno mimo jiné pomocí nadřazených neurohormonů allostatinu a allotropinu nebo pomocí nervových vzruchů. Působí také na úrovni DNA a jejich přenos hemolymfou do cílové tkáně je uskutečněn pomocí bílkovinného nosiče, který ho chrání před rozštěpením enzymy.

Tato skupina hormonů má největší uplatnění při metamorfóze. U nedospělých jedinců zajišťuje, aby metamorfóza nenastala dříve, než je jedinec plně vyvinutý a koordinuje tak dostatečnou výživu larev, respektive kukel. Jeho rovnovážná hodnota je nezbytná pro udržení správného vývoje, jeho výchyly vedou k vývojovým chybám. U dospělců se juvenilní hormony účastní řízení rozmnožování.

1.2.3.3. Peptidické neurohormony

Do skupiny peptidických neurohormonů řadíme velké množství (řádově až stovky) peptidů, které jsou nezbytné pro správné fungování všech procesů během hmyzího života. Jejich syntéza je spojena s neurosekretorickými buňkami centrální nervové soustavy; některé neurohormony považujeme za řídicí, jiné za výkonné.

Mezi nejdůležitější skupinu těchto hormonů patří PTTH, což je označení pro prothoracicotropní hormony, které vznikají v neurosekretorických buňkách mozku a mají na starosti činnost prothorakální žlázy a kontrolují tedy produkci ekdysteroidů.

Druhou velmi důležitou skupinu tvoří adipokinetické hormony, o kterých podrobně informuje následující kapitola.

1.2.4. Adipokinetické hormony

Adipokinetické hormony (AKH) patří do skupiny peptidických neurohormonů, do podskupiny hormonů řídících metabolismus a homeostázu. Tyto hormony tvoří jednu z nejpočetnějších a nejvíce prozkoumaných peptidických skupin. Dnes je u hmyzu známo již asi 60 zástupců. Byly popsány u všech významných hmyzích řádů včetně švábů. U švába amerického se vyskytují dva AKH zástupci. Jedná se o oktapeptidy (peptidy skládající se z 8 aminokyselin) označované jako Peram-CAH-I (*Periplaneta americana* cardioaccelerating hormone I) o složení: pGlu-Val-Asn-Phe-Ser-Pro-Asn-Trp-NH₂ a Peram-CAH-II o složení: pGlu-Leu-Thr-Phe-Thr-Pro-Asn-Trp-NH₂ (Scarborough a kol., 1984).

AKH jsou syntetizovány v endokrinní žláze corpora cardiaca, odkud jsou uvolňovány do hemolymfy a putují k cílovým tkáním. Tyto hormony mají několik důležitých funkcí, často jsou označovány jako stresové, neboť se vylučují ve stresových situacích. Mezi jejich primární funkce patří mobilizace lipidů nebo glycidů z tukového tělesa a jejich využití tkáněmi, hlavně svalovinou při pohybu. Podle této funkce (mobilizace lipidů) dostaly tyto hormony svůj název. Mobilizace lipidů začíná uvolněním AKH z corpora cardiaca, odtud dochází k transportu hormonů do buněk tukového tělesa (analog savčích jater a tukové tkáně). V nich je povrchovým membránovým receptorem převeden AKH signál na signál nitrobuněčný vytvořením tzv. druhého posla, což je nejčastěji cyklický adenosinmonofosfát (cAMP). Ten za přítomnosti vápenatého kationu aktivuje a spouští kaskádu, jejímž cílem je aktivovat lipázu ke štěpení triacylglycerolu na diacylglycerol - transportní formu tuků u hmyzu. Diacylglycerol se pak pomocí specifického nosiče přemístí hemolymfou do místa spotřeby, nejčastěji tedy do pracujícího svalu, kde se ve svalových buňkách rozkládá na glycerol a mastné kyseliny. Mastné kyseliny jsou odbourávány účinkem enzymů a poskytují organismu uvolněnou energii. Podobným mechanismem, také řízeným AKH, jsou v tukovém tělese odbourávány pomocí enzymu glykogen-fosforyláza zásoby glykogenu a vzniklý disacharid trehalóza (složená ze dvou molekul glukózy) slouží jako další zdroj energie (Gäde a kol., 1997).

AKH mají však řadu dalších funkcí, které doplňují primární funkci v mobilizaci živin. Mezi ně patří: stimulace srdeční činnosti, zvýšení napětí ve svalech, stimulace pohybové aktivity, aktivace imunitního systému, stimulace příjmu potravy a absorpce živin, inhibice syntézy lipidů, bílkovin a RNA, a některé další (Kodrík, 2008). Vydávání AKH z corpora cardiaca do hemolymfy je zpravidla zpětně kontrolováno hladinou metabolitů. Po ukončení působení dojde k deaktivaci AKH v hemolymfě pomocí endopeptidáz (Gäde a kol., 1997).

1.3. Šváb americký (*Periplaneta americana*)

1.3.1. Obecné informace

Šváb americký je živočich z kmene členovců (Arthropoda), podkmene vzdušnicovců (Tracheata). Patří do třídy hmyzu (Insecta) a řádu švábi – Blattodea. Je to hmyz s proměnou nedokonalou, který je kosmopolitně rozšířen.

Šváb americký je převážně noční živočich, který je hojnější ve městech, konkrétně ve veřejných budovách, nejčastěji ale ve skladech potravin a zemědělských produktů. Zde je považován na významného škůdce, protože konzumuje, ale hlavně znehodnocuje a znečišťuje

uložené potraviny. Ukrývá se na tmavých, vlhkých a teplých místech. Šváb americký je všežravec, který může hladovět až 5 týdnů. Švábi jsou obecně špatní letci, ale velmi dobří běžci. K pohybu využívají kráčivé a velmi dobře vyvinuté končetiny. Jsou schopni vnímat i velmi malé otřesy a zvuky o nízké frekvenci. Jde o plaché živočichy, kteří se svlékají 7-13x než dosáhnou stadia dospělce a dožívají se až 3 let. Jsou to jedni z nejodolnějších a nejprizpůsobivějších zástupců hmyzu, a proto se hojně chovají v laboratořích pro vědecké účely.

1.3.2. Morfologie

Dospělec švába amerického je červenohnědě zbarvený, dorůstá délky 35-50 milimetrů, má hnědý štít se žlutými okraji a se světlými skvrnami na křídlech. Najdeme u něj veškeré charakteristické znaky hmyzu. Jeho tělo je rozděleno na hlavu (caput), hrud' (thorax) a zadeček (abdomen), má 2 páry křídel a 3 páry nohou. Šváby považujeme za nejpůvodnější skupinu křídlatého hmyzu. Tato skupina se prakticky nezměnila od karbonu v prvohorách, kdy se na Zemi poprvé objevila.

Na hlavě se nachází velké složené oči, pár dlouhých tykadel a jednoduchá očka - ocelli. Dobře vyvinuty jsou čichové receptory, které jsou umístěny hlavně na tykadlech, ale najdeme je i na jiných částech těla, včetně pohlavních orgánů. Čich mimo jiné slouží k vyhledávání opačného pohlaví. Samice produkují feromony, samci zase afrodiziaka, která stimulují samice k páření. Na hlavě se nachází také kousací ústní ústrojí, které je tvořeno svrchním pyskem, párem mohutných kusadel, párem čelistí s článkovanými makadly a nepárovým spodním pyskem (je srostlý ze dvou částí). Ústní ústrojí směřuje dolů.

Hrud' je složena ze tří přibližně stejných velkých článků - předohruď (prothorax), středohruď (mesothorax) a zadohruď (metathorax). Každý hrudní článek nese 1 pár kráčivých končetin. Noha švába amerického se skládá z 5 částí - kyčel, příkyčlí, stehno, holeň a chodidlo tvořené 5 články, poslední nese většinou 2 drápky a na spodní straně se nachází přísavný polštářek. Hřbetní štít středo- a zadohruď je překryt dvěma páry křídel, první pár tvoří kožovité krytky (tegminae), druhý blanitá křídla. Jde o orgány, ve kterých se nacházejí vzdušnice a nervy, které jsou okem viditelné jako žilnatina. Zadeček tvoří celkem 11 článků, poslední jsou přeměněny a mají pohlavní funkci. Podle toho lze rozeznat, o jaké pohlaví se jedná - u samce se na zadečku nacházejí dva páry končetinových přívěsků, u samice pouze

jeden. Samice během svého života vytváří asi 40 oothék (14-18 vajíček v chitinové schránce). Oothéky odkládá 24 hodin po vynoření z pohlavního ústrojí. Vývoj švába amerického trvá 4-15 měsíců. Kromě pohlavních orgánů se na zadečku nachází řitní otvor a stigmata vzdušnic.

1.3.3. Anatomie a fyziologie

Stavba vnitřních orgánů a orgánových soustav švába amerického odpovídá stavebnímu plánu hmyzího těla. Povrch je kryt integumentem s chitinózní kutikulou (celý komplex se označuje také jako exoskelet), na který se upínají příčně pruhované svaly, které zajišťují pohyb. Cévní soustava je otevřená, poháněná trubicovitým srdcem, dýchání zajišťují vzdušnice. Odpadní látky jsou vylučovány Malpighickými trubicemi.

Řídící funkci má nervová a endokrinní soustava. Centrem nervové soustavy je mozek uložený v hlavové schránce, a systém ganglií ve zbytku těla spojených břišní nervovou páskou. Smyslové podněty jsou vnímány mechanoreceptory, termoreceptory, fotoreceptory a chemoreceptory.

Endokrinní soustava produkuje hormony. Jejich úkolem je řídit nitrobuněčné děje a ovlivňovat tak téměř veškeré děje v organismu. Mechanismus působení hormonů spočívá buď v aktivaci již existujících enzymů nebo v syntéze enzymů nových (viz kapitola 2).

1.3.3.1. Trávicí soustava a biochemie trávení

Trávicí soustava švába amerického má několik funkcí. Mezi ně patří zachycení potravy, její mechanické a chemické zpracování, a předání živin cévní soustavě. Nestravitelné zbytky jsou odstraňovány řitním otvorem ven z těla. Stavba střeva švába je dobře uzpůsobena tuhé formě přijímané potravy – střevo se skládá ze tří částí:

* Přední střevo (stomodeum), ve kterém dochází k mechanickému zpracování potravy a proto je zde velmi dobře vyvinutá svalovina. Stomodeum má několik částí - dutina ústní, pharynx (hltan), oesophagus (jícen), ingluvies (vole) a proventriculus (žvýkací žaludek).

* Střední střevo (mesenteron), ve kterém dochází k chemickému trávení potravy a vstřebávání živin – je to tedy funkčně nejdůležitější součást trávicí soustavy. Skládá se z ventricula a slepých výběžků (caeca). Epiteliální výstelka středního střeva je zřasená a spolu se slepými výběžky má za úkol zvětšit vnitřní plochu střeva. Na rozhraní předního a zadního střeva se tvoří peritrofická membrána, která vystýlá celé střední střevo; zamezuje přímému kontaktu

střeva se sliznicí a chrání tak buňky epitelu před mechanickým poškozením a také před působením enzymů a natrávením sliznice. Je to jemná blanka, která obsahuje chitin, bílkoviny a glykoproteiny, a je velmi podobná kutikule. Některé buňky středního střeva produkují také hormony, jejich funkce však není zcela jasná, ale předpokládá se, že se účastní trávicích procesů.

* Zadní střevo (proctodeum) se dělí na ileum, colon a rectum. Buňky jsou kryty kutikulou. Slouží k resorpci vody a solí a ústí řitním otvorem ven z těla. Svalovina střeva se na rozdíl od obratlovců skládá pouze z příčně pruhovaných svalů; na povrchu střeva se nachází tracheální (vzdušnicová) soustava.

Trávení živin začíná slinami, které vylučují slinné žlázy. Sliny potravu zvlhčují a upravují pH, čímž vytváří vhodné prostředí pro enzymy. Podstatná část chemického trávení však probíhá ve středním střevě, kde epiteliální buňky vylučují enzymy (Lehane a Billingsley, 1996). Činností enzymů dochází k rozkladu polymerů na monomery. pH střeva švába je většinou neutrální. Šváb je známý také tím, že se v různých částech jeho středního střeva tráví různé živiny, je zde tedy určitá prostorová specializace trávení (Tamaki a kol., 2014). Tento jev je známý u obratlovců, ale u hmyzu není příliš běžný. Chemické trávení živin pomocí enzymů probíhá následujícím způsobem:

* Trávení bílkovin je u švába zajištěno endo- a exopeptidázami, což jsou enzymy, které štěpí peptidické vazby bílkovin. Mezi nejčastější peptidázy patří serinové proteázy, trypsin a chymotrypsin. Tyto enzymy mají na aktivním místě molekulu serinu. Je popsána ale i přítomnost cysteinových a aspartátových proteáz.

* Trávení glycidů je celkem jednoduchý proces zahrnující štěpení jednoduchých cukrů, škrobu i glykogenu. Na štěpení těchto látek se podílí endo- a exoamylázy, a různé typy glykosidáz. Amylázy švába jsou výlučně typu alfa, glukosidázy typu alfa i beta. Šváb je schopen trávit také celulózu, což je hlavní stavební komponent zelených rostlin. Trávení celulózy je však komplikované a zpravidla závislé na symbiontech (hlavně bakteriích), které si švábi vzájemně předávají přes trusem kontaminovanou potravu. Ve středním střevě se vyskytují také trehalázy, chitinázy a některé další neobvyklé glykosidázy (Lehane a Billingsley, 1996).

* Trávení tuků je u švába zajištěno různými druhy lipáz, které štěpí především triglyceridy. Vyskytují se zde ale i fosfolipázy a esterázy.

Důležitou roli v metabolismu živin hraje tukové těleso, které u hmyzu zastupuje funkci jater, kde probíhají všechny důležité metabolické děje. U švába je bílé až žlutavé barvy a dělí se na 2 části. První z nich obklopuje zažívací trakt - periviscerální tukové těleso. Druhá část pak leží pod kutikulou - periferální tukové těleso.

1.4. Enzymy

1.4.1. Obecné informace

Enzymy se nazývají také biokatalyzátory. Jsou to látky bílkovinné povahy, které i v malém množství výrazně urychlují biochemické reakce v tělech organismů.

1.4.2. Stavba enzymů

Ve většině případů se enzymy skládají ze dvou částí. První část enzymu tvoří jednoduchá nebo složená bílkovina, která vykonává katalytickou funkci enzymu. Označujeme ji jako apoenzym. Druhou částí enzymu je kofaktor, který tvoří nebílkovinnou část. Je-li vazba mezi apoenzymem (bílkovinou) a kofaktorem slabá a může dojít k disociaci, označuje se kofaktor jako koenzym a jeho komplex s apoenzymem jako holoenzym. V případě, že se kofaktor pevně váže na bílkovinnou část, lze ho označit jako prosthetickou skupinu. Ta se k enzymu váže kovalentní vazbou na rozdíl od koenzymu, který je vázán k apoenzymu nekovalentně. Některé enzymy jsou v těle přítomny jako proenzymy – prekurzory enzymů v podobě neúčinných molekul, které se jednoduchou chemickou reakcí změň na účinné enzymy.

1.4.3. Klasifikace a názvosloví enzymů

Dříve se enzymy označovaly zejména triviálními názvy. Příkladem může být známý pepsin nebo trypsin. V roce 1961 zavedla Enzymová komise Mezinárodní unie biochemie (IUB) systémové (racionální) rozdělení enzymů do 6-ti hlavních skupin a z něj byly odvozeny systémové názvy enzymů. V těchto názvech je obsažen katalyzovaný substrát i typ reakce, na které se enzym podílí. Z uvedeného rozdělení také vyplývají upravené triviální názvy, které vystihují charakter enzymu. Koncovka -áza (-asa), byla až na výjimky zachována.

Hlavní skupiny enzymů:

* První a zároveň jednu z nejpočetnějších skupin tvoří - oxidoreduktázy. Katalyzují intermolekulové oxidačně-redukční procesy. Všechny enzymy této skupiny mají povahu složených bílkovin. Kofaktory těchto enzymů jsou například NAD⁺, NADP⁺, FAD. V reakcích přenášejí atomy vodíku (tyto enzymy označujeme jako dehydrogenázy, transhydrogenázy) nebo elektrony (transelektronázy). Zvláštním případem je vestavění atomu kyslíku do substrátu (oxygenázy).

* Druhou, velmi početnou, skupinou jsou - transferázy, které realizují přenos skupin v aktivované formě z donoru na akceptor. Jejich účast je též nezbytná v řadě biosyntetických procesů. Transferázy patří svou chemickou povahou do složených bílkovin. Přenášejí skupiny amino-, methyl-, acyl-, glykosyl-, fosforyl. Do této skupiny zařazujeme i kinázy, které přenášejí zbytek kyseliny trihydrogenfosforečné z ATP na jiný substrát. Enzymy této třídy označujeme např. jako aminotransferázy (transaminázy), acyltransferázy, fosfotransferázy.

* Třetí skupina enzymů nese název - hydrolázy. Řadíme sem velké množství enzymů povahy jednoduchých bílkovin, štěpících hydrolyticky vazby vzniklé kondenzací (peptidové, glykosidové, esterové vazby). Při štěpení se spotřebovává molekula vody. V místě štěpení vazeb hydrolázy naváží na jeden konec vodíkový kation a na druhý hydroxidový anion.

Mezi nejvýznamnější patří:

1. glykosidázy, které štěpí glykosidovou vazbu a složené sacharidy na di- a monosacharidy
2. lipázy mají za úkol štěpení esterové vazby v tucích, příkladem může být štěpení triacylglycerolů na glycerol a mastné kyseliny
3. proteázy, které štěpí peptidickou nebo též amidovou vazbu - například štěpení bílkovin na aminokyseliny

Dalšími příklady názvů mohou být amylázy, esterázy, peptidázy, fosfatázy.

* Čtvrtou skupinou nazývanou - lyázy tvoří malý počet enzymů, které mají strukturu složených bílkovin. Enzymy této skupiny katalyzují nehydrolytické štěpení a vznik vazeb (C-C, C-O, C-N). Ze substrátu odštěpují nebo do něj vkládají molekuly (H₂O, CO₂, NH₃,...) bez dalšího reaktantu. Chemickou podstatou je katalýza adiční reakce na dvojně vazbě nebo

eliminační reakce za vzniku dvojné vazby mezi atomy uhlíku. V triviálních názvech jsou často označovány jako syntházy.

* Izomerázy jsou enzymy 5. třídy, nejméně početně zastoupené skupiny. Podílí se na vnitromolekulových přesunech atomů, tedy na vzájemné přeměně izomerů, a to optických nebo polohových. Ve většině případů se jedná o jednoduché bílkoviny.

Patří sem například racemázy nebo epimerázy.

* Enzymy katalyzující vznik energeticky náročných vazeb za rozkladu látky uvolňující energii (často ve formě ATP), se nazývají - ligázy a tvoří 6. třídu. Jsou to složené bílkoviny, v triviálních názvech nesou označení synthetázy nebo karboxylázy .

1.4.4. Význam enzymů v organismu

Enzymy působí v tělech jako biokatalyzátory. Katalyzátory jsou chemické látky, které převádějí chemické reakce na méně energeticky náročnou dráhu, aniž by ovlivnily rovnovážný stav. Jde o látky, které se během reakce nespotebovávají, nemění složení systému, pouze zkracují čas potřebný k dosažení chemické rovnováhy. Působí ve velmi malém množství a jejich účinek je specifický.

Existují 2 typy katalyzátorů:

1. Pozitivní katalyzátory - katalyzátory, které urychlují průběh chemických reakcí, ale neovlivňují složení ani rovnováhu.
2. Negativní katalyzátory - katalyzátory, které zpomalují průběh reakce a výrazně zvyšují aktivační energii. Někdy jsou též označovány jako inhibitory. Využívají se ke zpomalování nežádoucích reakcí nebo chemických reakcí, které probíhají prudce, někdy i s výbuchem.

Jestliže srovnáme působení enzymů s obecnými katalyzátory chemických reakcí, tak lze konstatovat, že obě skupiny látek urychlují chemické reakce, aniž by ovlivnily rovnovážné složení substrátu, neboť zvyšují rychlost oběma směry reakce - tedy urychlují dosažení rovnovážného stavu, ale nemají vliv na hodnotu rovnovážné konstanty. Enzymy jsou však oproti chemickým katalyzátorům daleko účinnější - 1 molekula enzymu přemění až $5 \cdot 10^4$ molekul substrátu, u chemických katalyzátorů je tato rychlost o několik řádů nižší.

Dále:

- * Enzymy vykazují značnou specifitu (substrátovou nebo účinkovou).
- * Enzymy pracují za velmi mírných podmínek (teplota 20-40°C, tlak 0,1 MPa, pH většinou okolo 7).
- * Účinek enzymů lze snadno regulovat.
- * Velmi důležitou výhodou enzymů je jejich netoxičnost, chemické katalyzátory jsou zpravidla vysoce toxické.

Moje práce se týká sledování aktivity amyláz, proteáz a lipáz ve střevě švábů, proto o těchto skupinách enzymů uvedu několik podrobností.

1.4.5. Amylázy

Amylázy patří mezi glykosidázy, které štěpí O-glykosidickou vazbu mezi monosacharidovými jednotkami v oligosacharidu nebo polysacharidu. Za účasti vody vznikají na obou koncích štěpené vazby -OH skupiny, z nichž jedna patří poloacetalovému hydroxylylu v cyklické formě původně monosacharidové jednotky. Amylázy se dělí na 3 skupiny označované jako α , β a γ . Alfa-amylázy štěpí α -1,4-glykosidické vazby řetězců dlouhých polysacharidů, ze kterých odštěpují tří- a více glukózové jednotky; jsou hlavními glykosidázami živočichů. Beta-amylázy hydrolyzují také α -1,4-glykosidické vazby, ale s tím rozdílem, že z polysacharidového řetězce odštěpují vždy dvě poslední glukózové jednotky jako maltózu. Beta-amylázy jsou typické pro rostliny, houby a bakterie. Gama-amylázy štěpí α -1,4- nebo α -1,6-glykosidické vazby, a z polysacharidového řetězce odštěpují molekuly glukózy (Barman, 1969; Karlson, 1981; Vodrážka, 1999).

1.4.6. Proteázy

Proteázy patří do skupiny hydroláz, konkrétně mezi proteolytické enzymy, které štěpí proteiny (bílkoviny). Proteázy můžeme podle místa štěpení rozdělit do dvou základních skupin. První z nich jsou exoproteázy, které odštěpují aminokyseliny od terminálních konců proteinů. Naopak endoproteázy štěpí proteiny uvnitř peptidického řetězce a narušují jeho terciární strukturu. Z hlediska řízení chemických reakcí jsou důležitější endoproteázy.

Podle známého mechanismu účinku lze proteázy rozdělit do 4 skupin – serinové, cysteinové, aspartátové a metalloproteázy. Všechny tyto skupiny patří mezi endopeptidázy. Mezi exopeptidázy můžeme zahrnout skupinu metallopeptidáz.

1.4.7. Lipázy

Lipázy řadíme do skupiny hydroláz. Jedná se o enzymy, které rozštěpují tuky na glycerol a mastné kyseliny. Konkrétně jde o štěpení triacylglycerolů s mastnými kyselinami o řetězci delším než 12 uhlíků za vzniku diacyl- a monoacylglycerolů. U savců se ve velké koncentraci vyskytují v pankreatu a střevní stěně, ale v menším množství je můžeme najít v celém těle. Pro jejich aktivaci je důležitá přítomnost vápenatých iontů. Lipázy štěpí přijaté lipidy v gastrointestinálním systému (soustava žaludek-střevo), tuk orgánů je pak odbouráván orgánovými lipázami, například jaterními. Lipázy můžeme rozdělit do tří funkčních skupin. První z nich jsou vylučovány do trávicí soustavy, druhá skupina se nachází v tkáních, poslední skupinu můžeme najít v mléce. Lipázy mimo jiné řídí množství syntetizovaného tuku, zajišťuje redukci tukové zásoby a v optimálním množství jsou lipázy schopny pomoci při jeho spalování.

2. CÍLE PRÁCE

Cílem práce bylo:

1. Zmapovat aktivitu trávicích enzymů, amyláz ve střevě švába *Periplaneta americana*, a provést jejich biochemickou charakterizaci.
2. Provéřit, jestli je aktivita amyláz, proteáz a lipáz ovlivněna aplikací adipokinetických hormonů Peram-CAH-I a Peram-CAH-II v in vivo a in vitro systému, v caecách i ve střevě.

Téma práce je součástí rozsáhlého projektu, který studuje úlohy a vlastnosti adipokinetických hormonů v hmyzím těle. Protože tyto hormony kontrolují životně důležité procesy, je hlavním cílem projektu tyto procesy dobře poznat a pochopit, a přímo nebo nepřímo je ovlivňovat. Takové poznatky mohou někdy v budoucnu přispět ke kontrole populací škodlivých druhů hmyzu včetně švábů.

3. MATERIÁL A METODIKA

3.1. Chov švába amerického

Švábi *Periplaneta americana* použítí pro tuto práci pocházeli z laboratorních chovů Entomologického ústavu Biologického centra AVČR v Českých Budějovicích. Zvířata zde byla chována ve skleněných teráriích, kde se vyvíjela od vajíčka po dospělce. Jako zdroj potravy sloužil chléb, mrkev, ovoce a ovesné vločky. Voda jim byla poskytována z plastové lahvičky, která byla na konci ucpaná vatou. Chovy byly udržovány při konstantní teplotě $30 \pm 1^\circ\text{C}$ a fotoperiodě 12 hodin světlo a 12 hodin tma.

3.2. Aplikace adipokinetických hormon

3.2.1. Aplikace *in vivo*

Použité hormony Peram-CAH-I a – CAH-II (*Periplaneta americana* cardioaccelerating hormone I a II) byly syntetizovány firmou Vidia, Praha. Jejich aplikaci do švábů jsem prováděla injekčně pomocí Hamiltonovy stříkačky, kterou jsem hormon vpravila do těla v místě za třetí končetinou. Pokusné šváby jsem rozdělila do dvou skupin. První skupinu jsem injikovala uvedenými hormony rozpuštěnými ve 20 % metanolu v Ringerově fyziologickém roztoku pro hmyz o objemu 2–4 μl a vhodné koncentraci tak, aby výsledná hormonální dávka byla v rozmezí 1 - 160 pmol. Do jedinců druhé skupiny, která sloužila jako kontrola, jsem injikovala pouze 20 % metanol v Ringerově roztoku o stejném objemu.

3.2.2. *In vitro* kultivace

Při některých pokusech jsem testovala účinek Peram-CAH-I a -CAH-II na aktivitu střevních enzymů *in vitro* (tedy mimo tělo). Nejprve jsem ze švába vypitvala střední střevo a oddělené slepé výběžky střeva (caeca) – pitva je podrobně popsána v následující kapitole 5.3. Vypitvaný vzorek jsem vložila do 500 μl Graceho inkubačního média, do kterého jsem přidala příslušnou dávku hormonu. Objem média jsem odhadla tak, aby zhruba odpovídal objemu těla švába. Po 24 hodinách kultivace jsem vzorek vyjmula a dále zpracovala způsobem, jak je uvedeno níže.

3.3. Pitva švába amerického

Před zahájením pitvy jsem musela šváby držené ve velké sklenici umístit na cca 5-10 minut na led, aby se snížila jejich pohybová aktivita. Mezitím jsem si připravila základní pomůcky, které na pitvu potřebujeme: vosková miska, malé nůžky, 2 pitevní pinzety, špendlíky a binokulární pitevní mikroskop. Před zahájením vlastní pitvy jsem pomocí malých nůžek ustříhla švábovi hlavu a kvůli usnadnění pitvy i všechny páry nohou. Poté jsem tělo

švába u horní části hrudi a u zadečku dvěma špendlíky přišpendlila dorzální stranou dolů na voskovou misku, na které byla celá pitva prováděna, a švába umístila pod mikroskop. Dále jsem nůžkami rozstříhla tělní stěnu spolu s kutikulou (nebuněčná vrstva pokrývající povrch těla hmyzu s převážně ochrannou funkcí). Rozstříženou tělní stěnu jsem přišpendlila na voskovou misku pomocí dalších špendlíků a tím odkryla tělní dutinu těla švába. Všechny orgány byly obaleny tukovým tělesem, které jsem musela za pomoci pinzet odstranit. Přitom jsem podle potřeby přidávala Ringerův fyziologický roztok, aby tělo nevysychalo a nedošlo k poškození vnitřních orgánů. Potom jsem z těla pomocí pinzet vyjmula celé střevo a umístila ho do Petriho misky s Ringerovým roztokem. Zde jsem pomocí nůžek a pinzet opět pod mikroskopem oddělila stomodeum a proctodeum. Zbývající střední střevo (mesenteron) jsem ještě pečlivě očistila od zbytků tukového tělesa a trachejí dýchací soustavy a zbavila přebytečného fyziologického roztoku krátkým osušením na podložním sklíčku. Střevo jsem následně rozdělila na 2 části – vlastní střední střevo a slepé výběžky (caeca), u obou částí jsem následně měřila aktivitu jednotlivých enzymů (viz následující kapitoly 5.5. – 5.7.) zvlášť. Takto připravené vzorky jsem vložila do předem zvážené mikrozkušavky (Eppendorf), zkkušavku znovu zvážila, abych zjistila hmotnost vzorku a poté umístila do mrazničky do -24°C pro další použití. Alternativně jsem střevo vložila do inkubačního media a sledovala aktivitu enzymů in vitro (viz výše).

3.4. Extrakce enzymů ze středního střeva a caeca

1. Extrakční pufr pro amylázy:

- fosfátový pufr pH 5,7 s přidavkem 20mM NaCl: smícháme 93,5 ml KH_2PO_4 (2,722g/100 ml) a 6,5 ml Na_2HPO_4 (0,716g/100 ml); ke 100 ml pufru přidáme 2,05 ml 1M NaCl.

2. Extrakční pufr pro proteázy a lipázy:

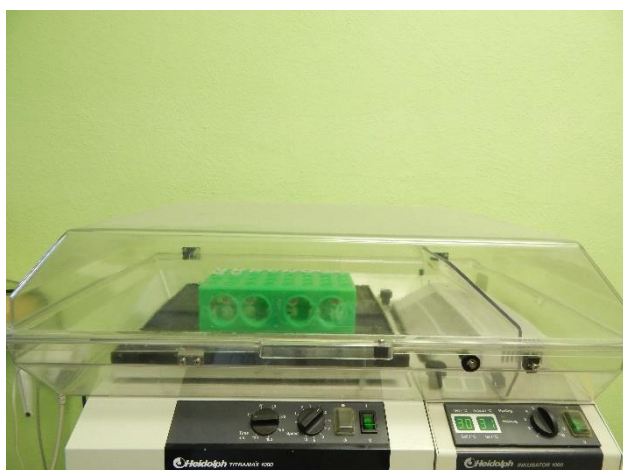
- 0,2 M Tris, pH 7,8.

Ze středního střeva (mesenteron) a slepých výběžků střeva (caeca) švába bylo třeba po pitvě nebo po inkubaci extrahovat testované enzymy. Vlastní extrakci enzymů jsem prováděla v příslušném pufru (viz výše), přičemž jsem při všech jejích krocích vzorky neustále uchovávala na ledu, aby nedošlo k degradaci stanovovaných enzymů. Ke každému vzorku jsem přidala 200 μl (pro amylázy) nebo 500 μl (pro proteázy a lipázy) pufru a následně v něm tkáň rozdrtila za pomoci jehlového sonikátoru (cca 15-20 vteřin, za neustálého chlazení ledem). Během sonikace jsem obsah v eppendorfce průběžně sledovala, dokud nebyly všechny pevné části střeva rozdrceny. Po sonikaci jsem vzorky odstředila v centrifuze (2

minuty na 10000 otáček). Následně jsem odpipetovala supernatanty do nové sady eppendorfek a umístila v mrazničce v -24°C , kde jsem je skladovala k dalšímu užití.



Obr. č.1. Příprava DNS reagentie na magnetické míchače TYPE MM, Polsko



Obr. č. 2. Inkubace reakční směsi v inkubátoru Titramax 1000, Heidolph, Německo

3.5. Stanovení amylázové aktivity pomocí rozpustného škrobu

Aktivitu amyláz jsem stanovovala metodou podle Bernfelda (1955) modifikovanou v práci Kodríka a kol. (2012). V předkládané práci jsem metodiku přizpůsobila situaci ve střevě u švába *P. americana*.

Reagencie:

- DNS (kyselina 3,5-dinitrosalicylová) - 0,0125g, K-Na tartare $\times 4\text{H}_2\text{O}$ - 7,5g, NaOH - 0,4g
- 2% škrob (rozpustný ve vodě)
- fosfátový pufr pH 5,7 + 20 mM NaCl (viz výše)

Nejprve jsem si připravila potřebné reagenty. DNS (Obr. č. 1), K-Na tartare.4H₂O a NaOH jsem rozpustila v 10 ml destilované H₂O a poté doplnila pomocí pipety na 25 ml. Substrátový roztok jsem připravila dalším zředěním 2% roztoku škrobu v poměru 1:1 pomocí fosfátového pufru s 20 mM NaCl. Vlastní amylázovou reakci jsem prováděla v eppendorfci, kde jsem smíchala 25 µl substrátového roztoku škrobu a 25 µl vzorku, který ve většině případů odpovídal 0.005 ekvivalentu celého střeva/caeca. Pokusná sada vždy obsahovala také slepý vzorek (blank), který obsahoval pouze 25 µl škrobového roztoku a 25 µl fosfátového pufru. Všechny takto připravené vzorky jsem inkubovala 40 minut při 30°C (Obr. č. 2). Poté jsem reakci zastavila přidáním 200 µl DNS reagentu. V dalším kroku jsem eppendorfky povařila 5 minut při 100°C v blokovém termostatu a po jejich ochlazení centrifugovala 10 minut při 10000 otáčkách. Ekvivalent 200 µl supernatantu každého vzorku jsem přepipetovala do 96-jamkové mikrodestičky a měřila absorbanci roztoků při 550 nm na ELISA čtečce (Obr. č. 3).



Obr. č.3. ELISA čtečka Spectra Max 340 PC, Molecular Devices, USA

3.6. Stanovení proteázové aktivity pomocí resorufin-kaseinu

Aktivitu proteáz jsem stanovovala pomocí resorufin kaseinového kitu firmy Roche a k němu přiloženého návodu. V předkládané práci jsem metodiku přizpůsobila situaci ve střevě u švába *P. americana*.

Reagenty:

- 0,2M Tris, pH 7,8
- 0,02M CaCl₂
- 0,4% resorufin kasein (rozpuštěný ve vodě)
- 5% kyselina trichloroctová (TCA)

Nejprve jsem si připravila potřebné reagenty. Vlastní proteázovou reakci jsem prováděla v eppendorfci, kde jsem smíchala 20 μ l 0,02M CaCl₂, 20 μ l resorufin kaseinu a 60 μ l vzorku extrahovaného v 0,2M Trisu. Pokusná sada vždy obsahovala také slepý vzorek (blank), který obsahoval 20 μ l 0,02M CaCl₂, 20 μ l resorufin kaseinu a 60 μ l 0,2M Trisu.. Všechny takto připravené vzorky jsem inkubovala 1 hodinu při 37°C. Poté jsem reakci zastavila přidáním 240 μ l kyseliny trichloroctové a následně ještě inkubovala dalších 10 minut. V dalším kroku jsem eppendorfky centrifugovala 3 minuty při 10000 otáčkách. Ekvivalent 300 μ l supernatantu každého vzorku jsem přepipetovala do 96-jamkové mikroděstičky a měřila absorbanci roztoků při 490 nm na ELISA čtečce (Obr. č. 3).

3.7. Stanovení lipázové aktivity kinetickou fluorescencí

Aktivitu lipáz jsem stanovovala metodou podle Robertse (1985). V předkládané práci jsem metodiku přizpůsobila situaci ve střevě u švába *P. americana*.

Reagenty:

- 0,2M Tris, pH 7,8
- 50mM 4MU-butyrate (MW=246,26) – 0,0123 gramů substrátu rozpustíme v 1 ml DMSO, roztok rozpipetujeme po 40 μ l a skladujeme v tmavých eppendorfkách při teplotě 20°C, na test je potřeba vzorek 25x zředit.

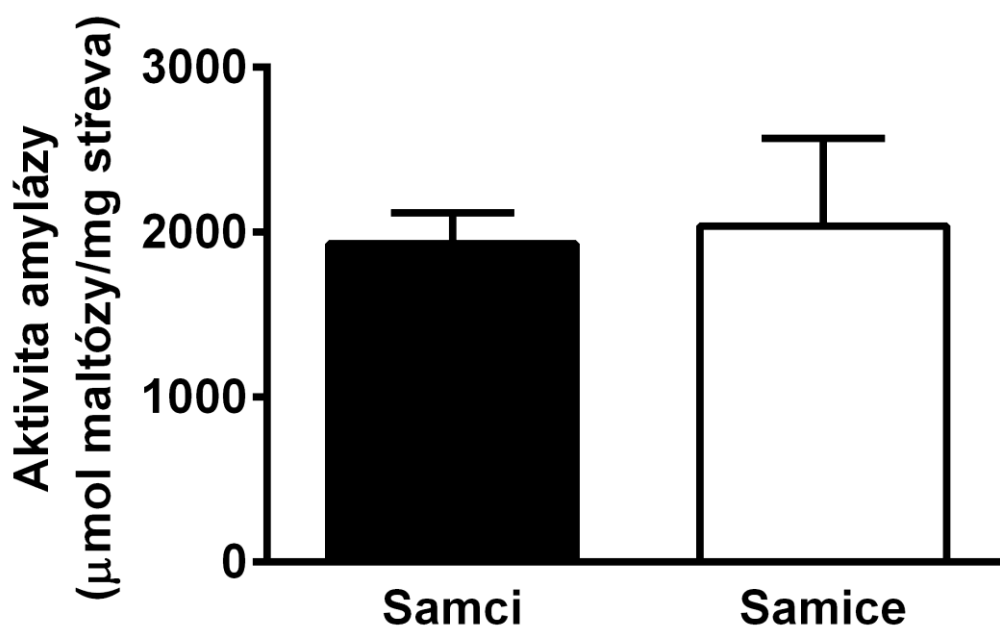
Nejprve jsem si připravila potřebné reagenty. Vlastní lipázovou reakci jsem prováděla v tmavých destičkách, kde jsem smíchala vzorek s 0,2M Trisem tak, aby součet objemů byl 195 μ l (pro testy jsem brala 1/1000 orgánu). Pokusná sada vždy obsahovala také slepý vzorek (blank), který obsahoval 195 μ l 0,2M Trisu. Ke všem vzorkům jsem přidala 5 μ l substrátu 50mM 4MU-butyrate v DMSO. Lipázovou aktivitu jsem měřila kinetickou fluorescencí 327nm/449nm exc/em.

3.8. Příprava grafů a statistické zpracování

Grafy jsem sestrojila pomocí GraphPad Software verze Prism 6 (San Diego, California) který jsem použila i pro testy stanovení statistické průkaznosti výsledků. Pro porovnání výsledků uvedených v Obr. 4 jsem použila klasický Studentův t-test, pro výsledky v Obr. 5-16 pak jednocestná ANOVA s Dunnettovým post-testem na 5% hladině průkaznosti. Tento posledně jmenovaný test srovnává jednu vybranou hodnotu (kontrolu nebo kteroukoliv jinou označenou jako referenční) s ostatními hodnotami.

4. VÝSLEDKY

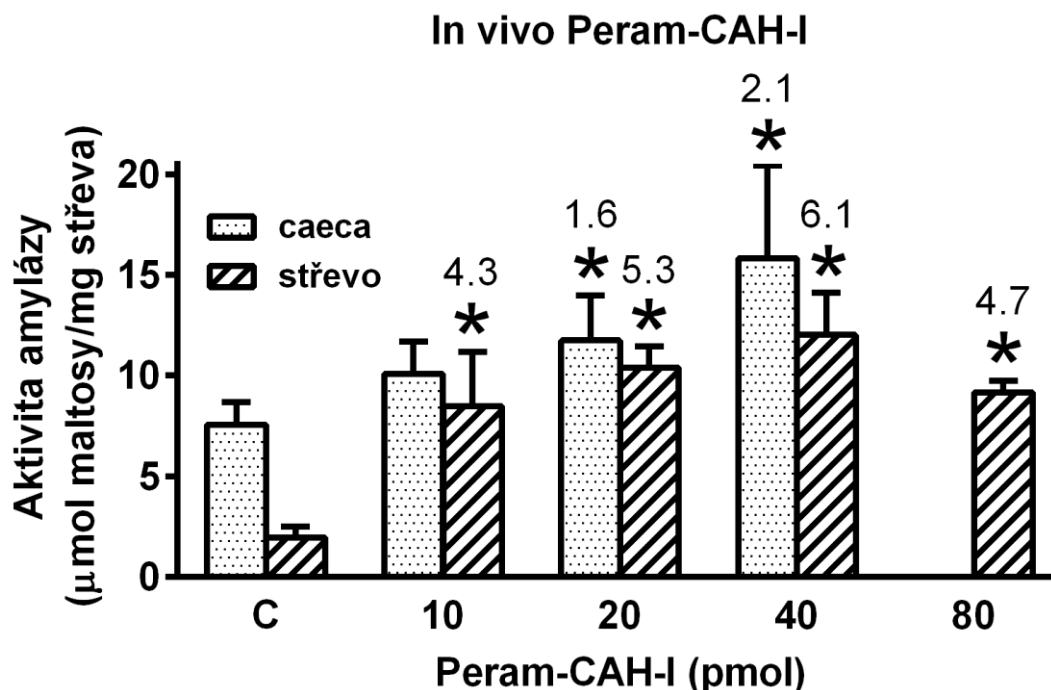
V první sérii experimentů jsem srovnávala aktivitu amyláz u samců s aktivitou u samic (Obr. 4), abych zjistila, které pohlaví je pro plánované pokusy vhodnější. Hodnoty aktivit byly velmi podobné a mezi pohlavími nebyl zjištěn žádný statisticky významný rozdíl. Proto jsem na testy mohla vybírat šváby bez ohledu na pohlaví jedinců.



Obr. 4. Vliv pohlaví na aktivitu amyláz ve střevě švába *P. americana*. Nebyl zjištěn statistický rozdíl mezi hodnotami pomocí Studentova t-testu na 5% hladině významnosti; n=5.

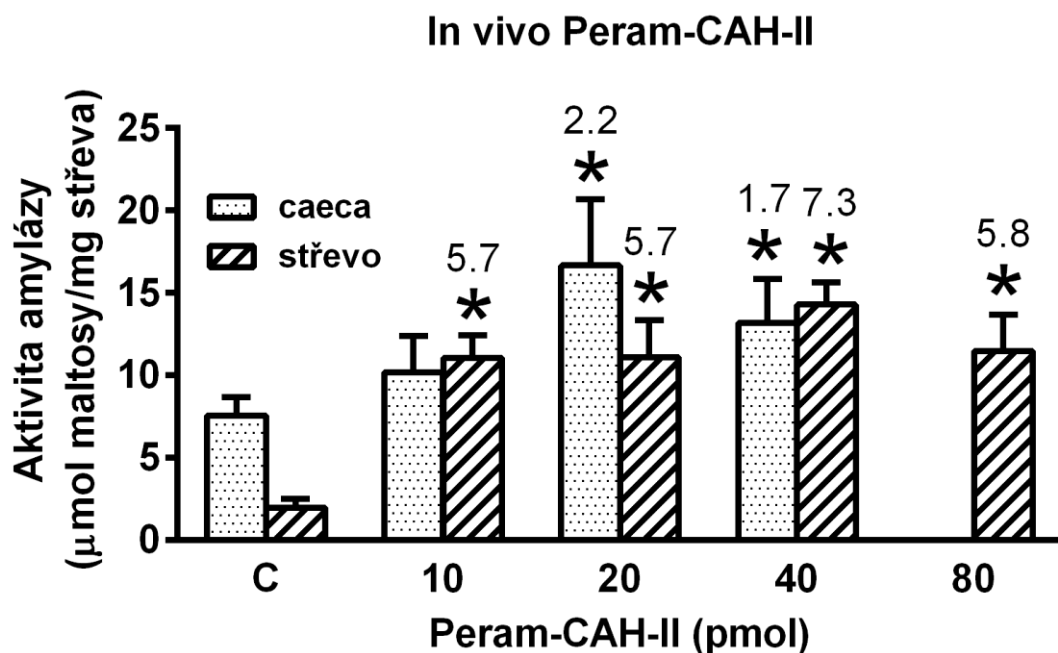
Po vypracování základních podmínek pokusů (pH, teplota) jsem se zabývala otázkou řízení aktivity střevních amyláz prostřednictvím hormonů. V první sérii jsem do těla švábů injikovala jejich adipokinetické hormony (Peram – CAH-I a –CAH-II) (test in vivo) nebo jsem je aplikovala do média, ve kterém jsem střevo nebo caeca inkubovala mimo tělo v médiu (in vitro). Obr. 5 shrnuje výsledky in vivo pokusů: nejvyšší aktivitu pro střední střevo jsem zaznamenala u dávky 40pmol Peram-CAH-I. Aktivita střevních amyláz byla u takto ošetřených švábů asi 6x vyšší než u kontrolních jedinců, ale všechny použité hormonální dávky měly statisticky významný stimulační účinek. Nejvyšší amylázová aktivita pro caeca byla zaznamenána také u dávky 40 pmol - zvýšila se asi dvojnásobně. Je zajímavé, že celková aktivita amyláz byla v caeca vyšší než u střeva – u kontrolních jedinců to bylo

dokonce dvakrát, u hormonálně ošetřených jedinců už rozdíl nebyl tak velký, protože Peram-CAH-I zvyšoval amylázovou aktivitu u střeva podstatně více než u caeca.



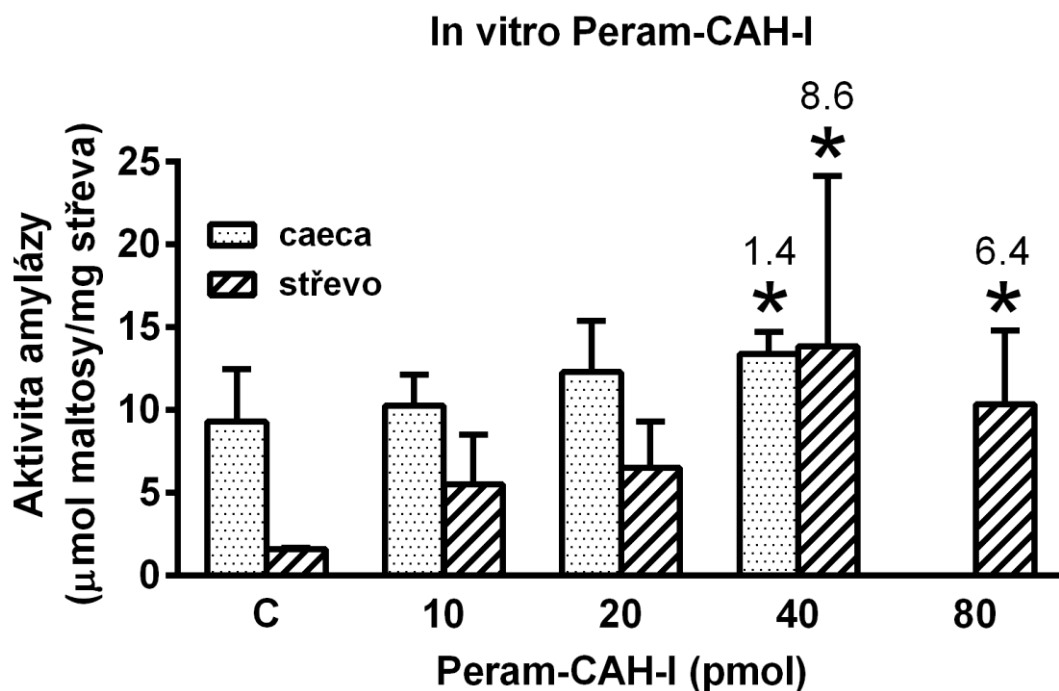
Obr. 5. Vliv injekce adipokinetického hormonu Peram-CAH-I na aktivitu amyláz ve střevě a caeca švába *P. americana* (in vivo). Čísla nad sloupci představují zvýšení (násobek) dané hodnoty vůči hodnotě naměřené ve stejném orgánu u kontrol. Statisticky významné rozdíly na 5% hladině významnosti byly testovány jednocestnou analýzou variance (ANOVA) s Dunnettovým post testem (referenční hodnota: C - kontrola) a jsou označeny hvězdičkami; n=5.

Podobný výsledek jsem zaznamenala při sledování účinku druhého švábiho hormonu Peram-CAH-II také za podmínek in vivo (Obr. 6). Nejvyšší aktivitu jsem zaznamenala znovu u 40 pmol Peram-CAH-II, kde se stimulační účinek ve střevě projevil více než 7násobným navýšením aktivity amyláz vůči kontrolám; ale všechny použité dávky Peram-CAH-II měly statisticky významný stimulační účinek. U caeca byla situace podobná jako v předchozím testu s tím rozdílem, že nejvyšší naměřená aktivita byla prokázána u dávky 20pmol hormonu Peram-CAH-II. Také zde se prokázala vyšší citlivost na hormonální ošetření u střeva než u caeca. Z výsledků dále plyne, že mezi oběma testovanými hormony nebyly ve stimulaci aktivity amylázy podstatné rozdíly.



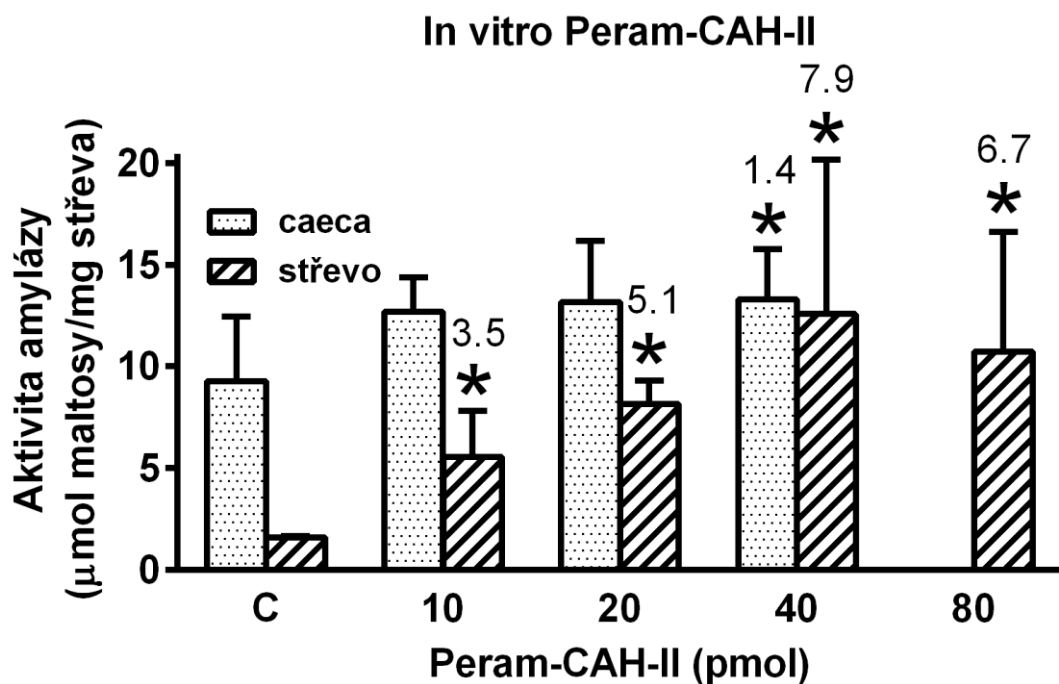
Obr. 6. Vliv injekce adipokinetického hormonu Peram-CAH-II na aktivitu amyláz ve střevě a caeca švába *P. americana* (in vivo). Statisticky významné rozdíly na 5% hladině významnosti byly testovány jednocestnou analýzou variance (ANOVA) s Dunnettovým post testem (referenční hodnota: C - kontrola) a jsou označeny hvězdičkami; n=5.

V další fázi pokusů jsem sledovala, jestli použité hormony zvyšují aktivitu amyláz přímo nebo je jejich účinek v těle zprostředkovaný dalšími faktory. K tomu jsem použila in vitro uspořádání pokusů. Testy jsem prováděla znovu ve středním střevě i v caeca (Obr. 7). Určité zvýšení aktivity amyláz ve střevě jsem zaznamenala u všech použitých dávek Peram-CAH-I, ale nejvyšší hodnota byla u dávky 40 pmol – téměř 9x vyšší než u kontrol; statisticky významná byla stimulace i u dávky 80 pmol (6x vyšší než kontrola). Pro caeca nebyla stimulace téměř znatelná, jediná statisticky významná hodnota byla zaznamenána u dávky 40pmol, kdy se aktivita zvýšila 1,4krát. Také u in vitro pokusů se prokázalo, že hladina aktivity amyláz je vyšší v caeca (u kontrol pětkrát) než ve střevě; u dávky 40 pmol se však rozdíl zcela setřel díky velmi vysoké stimulaci aktivity po hormonálním ošetření u střeva. Je zajímavé, že se potvrdil trend naznačený už u in vivo pokusů – dávky adipokinetických hormonů vyšší než optimální vykazovaly nižší stimulační hodnotu.



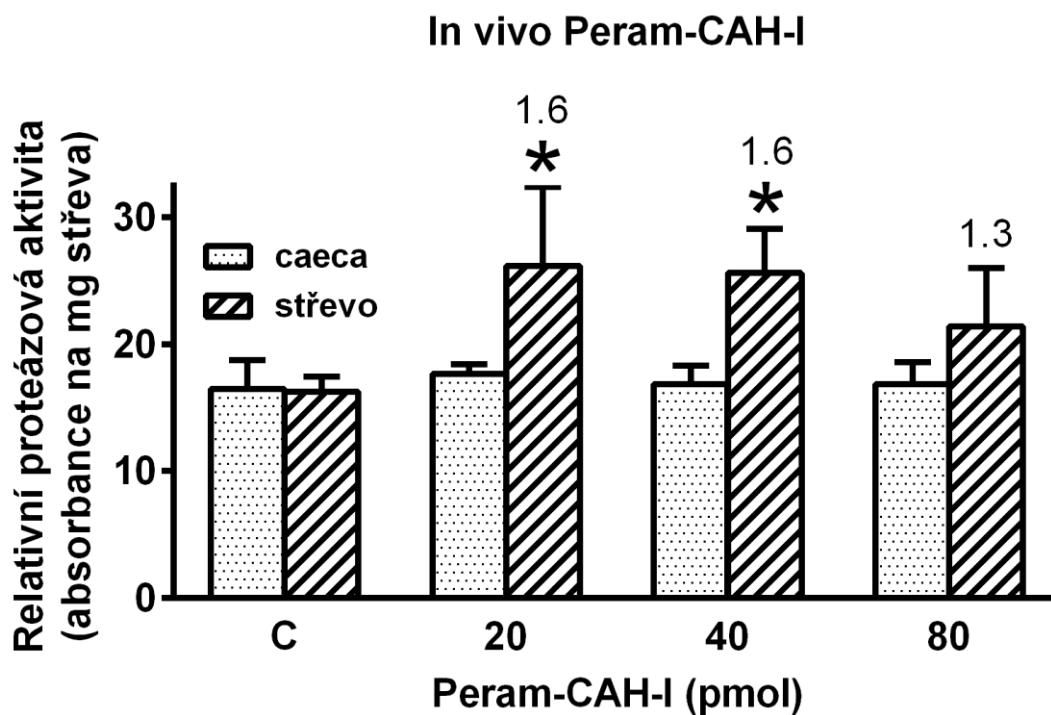
Obr. 7. Vliv injekce adipokinetického hormonu Peram-CAH-I na aktivitu amyláz ve střevě a caeca švába *P. americana* (in vitro). Statisticky významné rozdíly na 5% hladině významnosti byly testovány jednocestnou analýzou variance (ANOVA) s Dunnettovým post testem (referenční hodnota: C - kontrola) a jsou označeny hvězdičkami; n=5.

V rámci in vitro pokusů jsem prováděla testy i pro hormon Peram-CAH-II (Obr. 8). Nejvyšší aktivitu střevních amyláz jsem zaznamenala opět u dávky 40 pmol (asi 8x vyšší než kontroly u střeva, 1,4krát vyšší pro caeca); také rozdíly v aktivitě u obou orgánů byly podobné jako u předešlého testu. Celkové zvýšení aktivity ukázalo, že ani u in vitro testů nejsou podstatné rozdíly mezi oběma testovanými hormony.



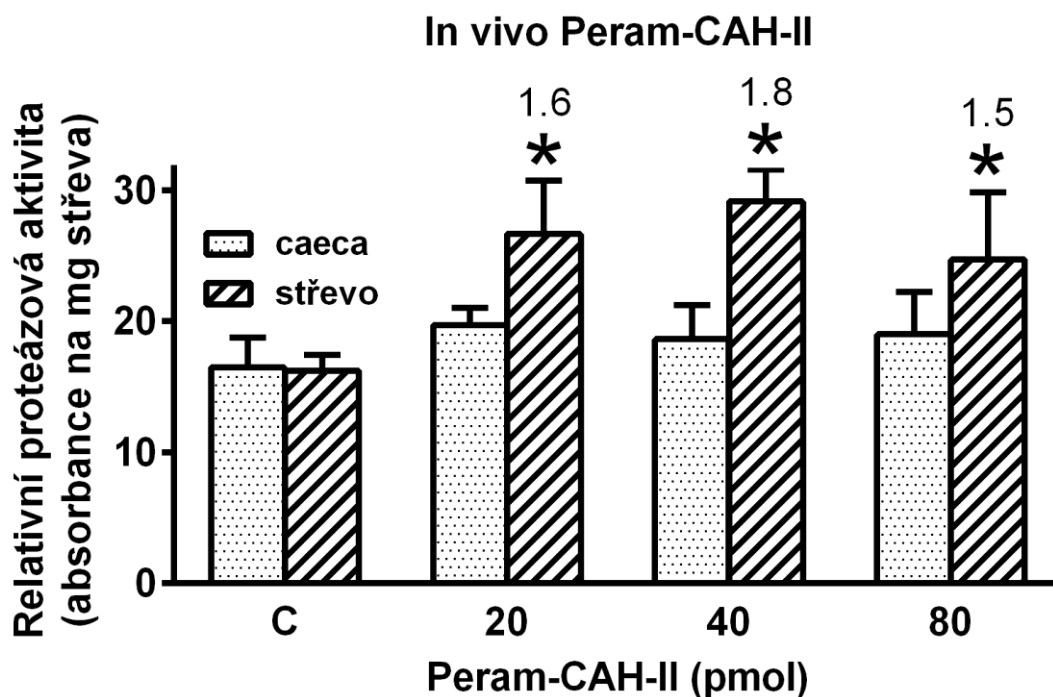
Obr. 8. Vliv injekce adipokinetického hormonu Peram-CAH-II na aktivitu amyláz ve střevě a caeca švába *P. americana* (in vitro). Statisticky významné rozdíly na 5% hladině významnosti byly testovány jednocestnou analýzou variance (ANOVA) s Dunnettovým post testem (referenční hodnota: C - kontrola) a jsou označeny hvězdičkami; n=5.

Po dokončení kompletních testů pro amylázy jsem sestavila podobné charakteristiky i pro proteázy. Nejprve jsem se zaměřila na in vivo testy ve střevě i caeca. Nejvyšší proteázovou aktivitu jsem zaznamenala u dávky Peram-CAH-I 40pmol, kdy se aktivita oproti kontrolám zvýšila 1,6krát; pro caeca nebylo zjištěné žádné významné zvýšení proteázové aktivity u ošetřených jedinců (Obr. 9). Na rozdíl od amylázové aktivity byla aktivita proteáz v caeca i střevě u kontrolních jedinců stejná, poté co byla hormonální stimulace zaznamenána pouze u střeva, převažovala aktivita proteáz po ošetření Peram-CAH-I v tomto orgánu.



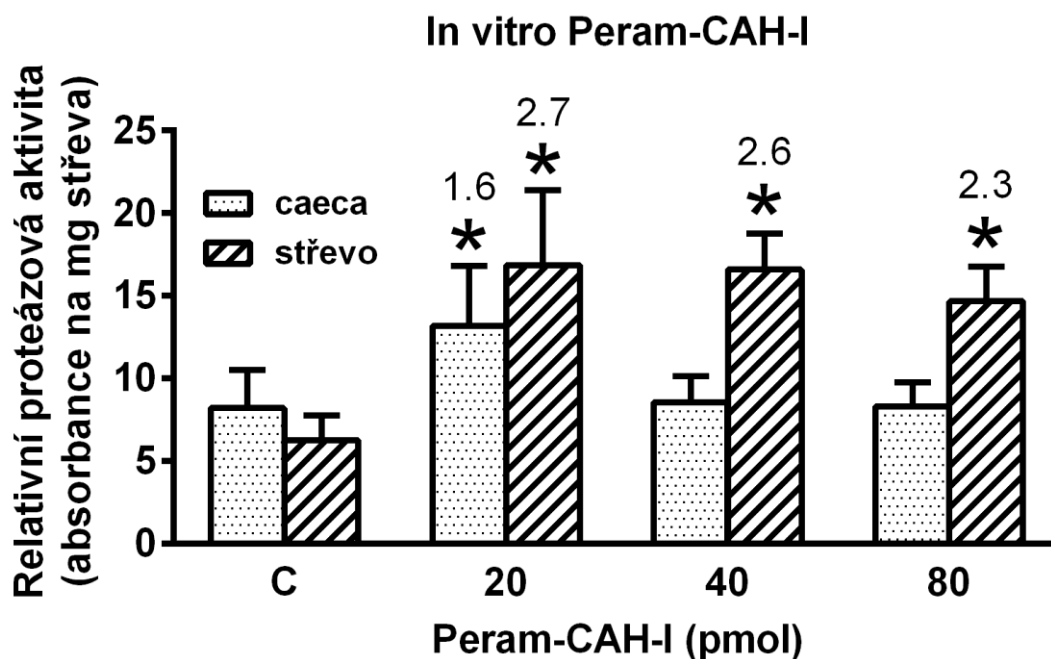
Obr. 9. Vliv injekce adipokinetického hormonu Peram-CAH-I na aktivitu proteáz ve střevě a caeca švába *P. americana* (in vivo). Statisticky významné rozdíly na 5% hladině významnosti byly testovány jednocestnou analýzou variance (ANOVA) s Dunnettovým post testem (referenční hodnota: C - kontrola) a jsou označeny hvězdičkami; n=5.

Pro druhý hormon Peram-CAH-II jsem získala stejné výsledky (Obr. 10). Proteázová aktivita pro caeca nebyla opět po aplikaci hormonu zvýšena, naopak ve střevě došlo k významnému nárůstu pro všechny dávky; nejvyšší ale byla opět u dávky 40pmol.



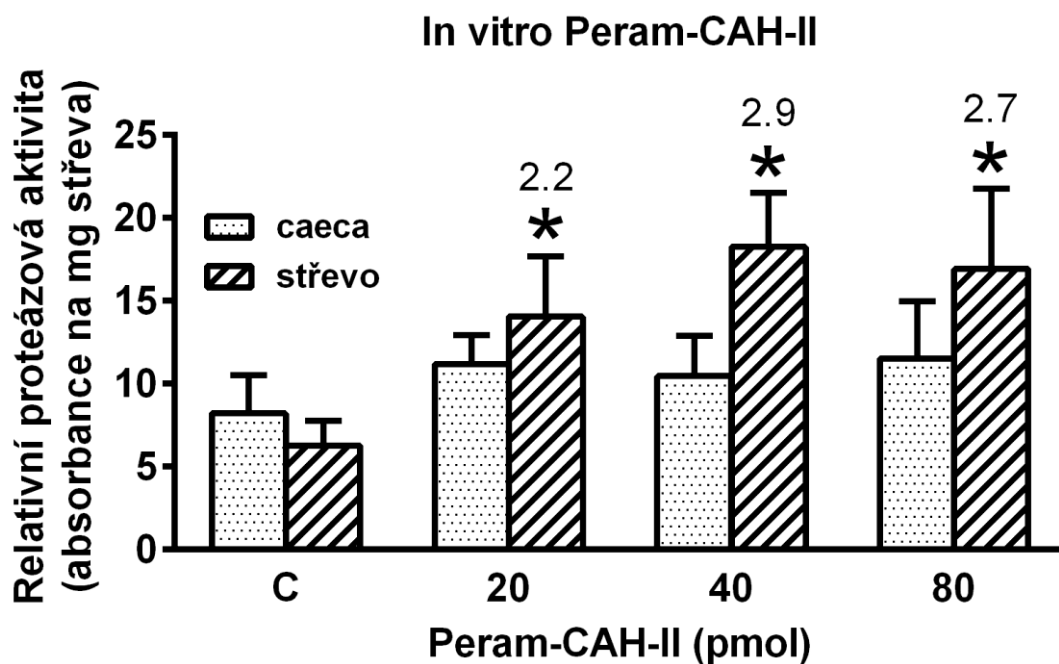
Obr. 10. Vliv injekce adipokinetického hormonu Peram-CAH-II na aktivitu proteáz ve střevě a caeca švába *P. americana* (in vivo). Statisticky významné rozdíly na 5% hladině významnosti byly testovány jednocestnou analýzou variance (ANOVA) s Dunnettovým post testem (referenční hodnota: C - kontrola) a jsou označeny hvězdičkami; n=5.

V další fázi pokusů jsem opět sledovala, jestli použité hormony zvyšují aktivitu proteáz také při uspořádání in vitro. Testy jsem prováděla znovu jak ve středním střevě, tak i v caeca. Podobně jako u in vivo testů, ani in vitro nebyl v porovnání s amylázami zjištěn takový nárůst hormonálně stimulované aktivity, ale statistické zvýšení bylo zaznamenáno u všech dávek hormonu Peram-CAH-I (ve střevě), tentokrát nejvyšší pro 20pmol – nárůst 2,7krát (Obr. 11). V caeca byla aktivita významně statisticky zvýšená pouze pro dávku 20 pmol, kde aktivita proteáz vzrostla 1,6násobně. Také zde byla proteázová aktivity po hormonálním ošetření vyšší u střeva než u caeca.



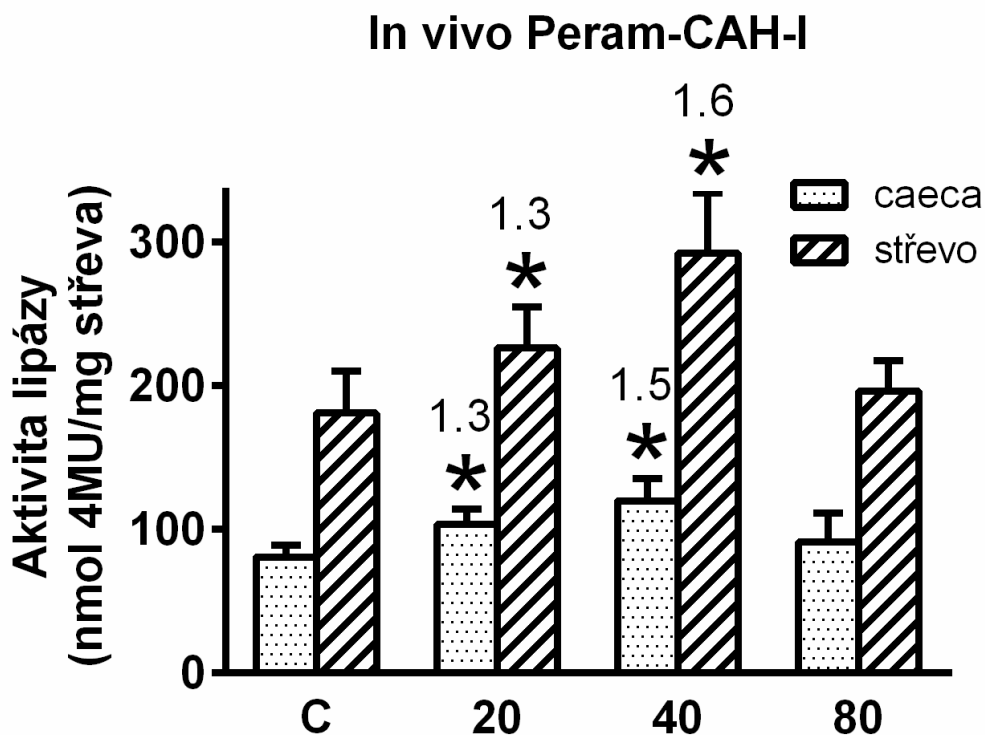
Obr. 11. Vliv injekce adipokinetického hormonu Peram-CAH-I na aktivitu proteáz ve střevě a caeca švába *P. americana* (in vitro). Statisticky významné rozdíly na 5% hladině významnosti byly testovány jednocestnou analýzou variance (ANOVA) s Dunnettovým post testem (referenční hodnota: C - kontrola) a jsou označeny hvězdičkami; n=5.

Pro druhý hormon Peram-CAH-II při in vitro testech došlo k nejvyššímu zvýšení proteázové aktivity u dávky 40pmol - 2,9krát pro střevo (Obr. 12). Při měření aktivit u caeca znovu nebylo zjištěno významné zvýšení pro žádnou z použitých dávek. Aktivita po aplikaci hormonu byla velmi podobná aktivitě neošetřených jedinců.



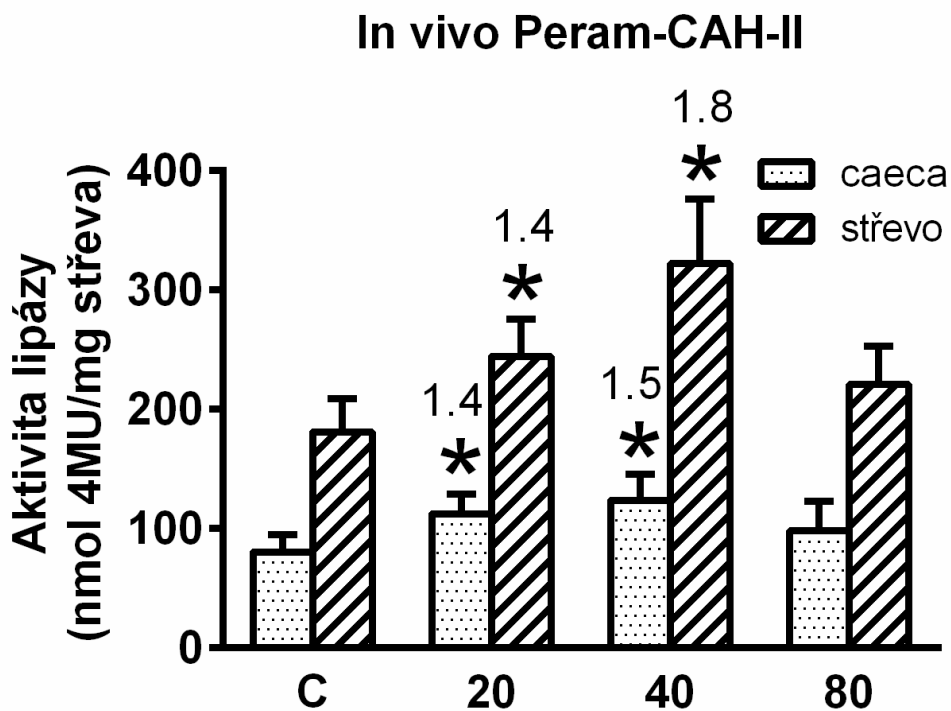
Obr. 12. Vliv injekce adipokinetického hormonu Peram-CAH-II na aktivitu proteáz ve střevě a caeca švába *P. americana* (in vitro). Statisticky významné rozdíly na 5% hladině významnosti byly testovány jednocestnou analýzou variance (ANOVA) s Dunnettovým post testem (referenční hodnota: C - kontrola) a jsou označeny hvězdičkami; n=5.

V poslední fázi své práce jsem prováděla charakteristiku aktivity lipáz po aplikaci adipokinetických hormonů, in vivo i in vitro. Pro hormon Peram-CAH-I (in vivo test) byla nejvyšší stimulace zjištěna u dávky 40pmol, kdy byl zaznamenán téměř 1,6ti násobný nárůst aktivity (střevo); pro caeca došlo u stejné dávky k navýšení 1,5krát (Obr. 13). U lipázové aktivity byla zaznamenána výrazně vyšší aktivita ve střevě než v caeca. U kontrol byla dvojnásobná a na podobné úrovni se udržovala i u hormonálně ošetřených jedinců, protože aplikace hormonu vyvolávala podobnou stimulaci lipázové aktivity u obou studovaných orgánů.



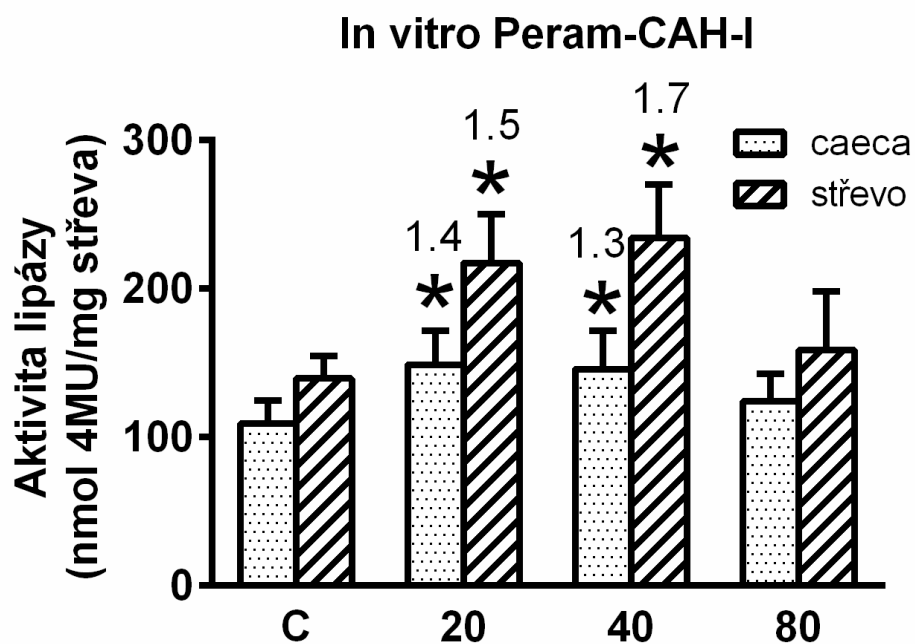
Obr. 13. Vliv injekce adipokinetického hormonu Peram-CAH-I na aktivitu lipáz ve střevě a caeca švába *P. americana* (in vivo). Statisticky významné rozdíly na 5% hladině významnosti byly testovány jednocestnou analýzou variance (ANOVA) s Dunnettovým post testem (referenční hodnota: C - kontrola) a jsou označeny hvězdičkami; n=5.

Pro druhý hormon Peram-CAH-II byly výsledky měření lipázové aktivity velmi podobné prvnímu hormonu. Nejvyšší aktivitu vyvolala dávka 40pmol – pro střevo 1,8krát vyšší aktivita, pro caeca znovu 1,5násobné zvýšení (Obr. 14). Nejvyšší dávka - 80 pmol - podobně jako u prvního hormonu (Peram-CAH-I) už neměla stimulační účinky na aktivitu lipázy ani u jednoho orgánu.



Obr. 14. Vliv injekce adipokinetického hormonu Peram-CAH-II na aktivitu lipáz ve střevě a caeca caeca švába *P. americana* (in vivo). Statisticky významné rozdíly na 5% hladině významnosti byly testovány jednocestnou analýzou variance (ANOVA) s Dunnettovým post testem (referenční hodnota: C - kontrola) a jsou označeny hvězdičkami; n=5.

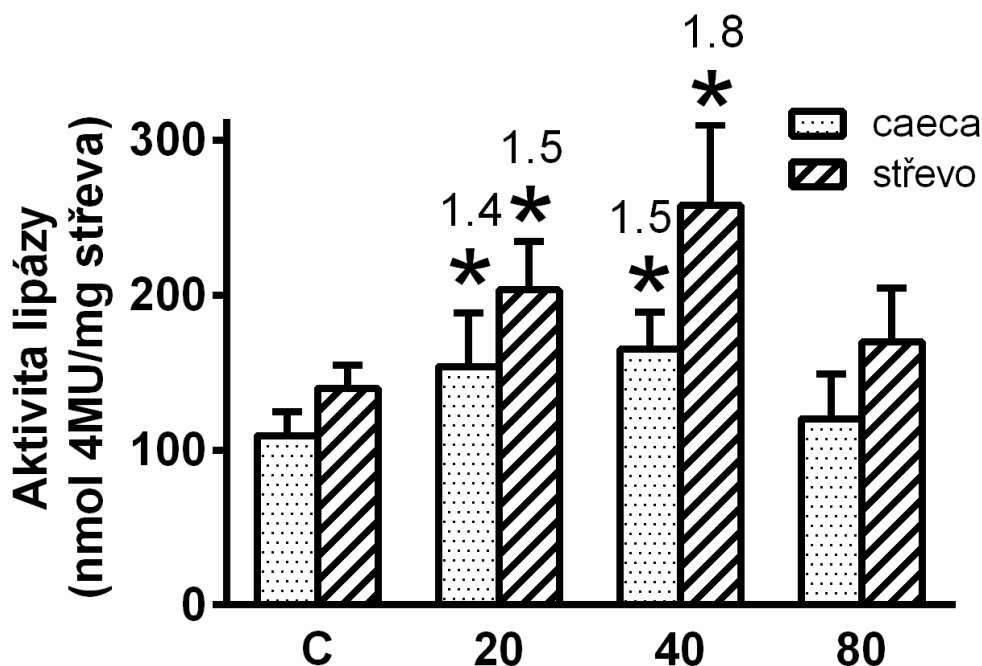
Výsledky in vitro testů pro oba hormony vycházely velmi podobně jako u in vivo testů. Při aplikaci hormonu Peram-CAH-I došlo k nejvýraznější změně znovu u dávky 40pmol – byl zaznamenán nárůst 1,7krát pro střeva (Obr. 15). Pro caeca došlo k nejvyššímu nárůstu u dávky 20pmol, změřená aktivita byla 1,4krát vyšší.



Obr. 15. Vliv injekce adipokinetického hormonu Peram-CAH-I na aktivitu lipáz ve střevě a caeca švába *P. americana* (in vitro). Statisticky významné rozdíly na 5 % hladině významnosti byly testovány jednocestnou analýzou variance (ANOVA) s Dunnettovým post testem (referenční hodnota: C – kontrola) a jsou označeny hvězdičkami; n=5.

Stejný trend byl zaznamenán i u hormonu Peram-CAH-II (Obr, 16): nejvýraznější nárůst byl prokázán u dávky 40pmol, u střeva došlo k 1,8násobnému zvýšení lipázové aktivity, u caeca k 1,5násobnému. Dávka 80 pmol byla neúčinná.

In vitro Peram-CAH-II



Obr. 16. Vliv injekce adipokinetického hormonu Peram-CAH-II na aktivitu lipáz ve střevě a caeca švába *P. americana* (in vivo). Statisticky významné rozdíly na 5% hladině významnosti byly testovány jednocestnou analýzou variance (ANOVA) s Dunnettovým post testem (referenční hodnota: C - kontrola) a jsou označeny hvězdičkami; n=5.

5. DISKUZE

Hlavní funkcí trávicí soustavy u živočichů je zachytit potravu, mechanicky a chemicky ji zpracovat a zajistit tak tělu potřebné živiny. Nejinak je tomu i u hmyzu. Je všeobecně známo, že enzymatická výbava hmyzího střeva odpovídá druhu přijímané potravy. Šváb americký je typickým příkladem všežravého (omnivorního) druhu hmyzu - jeho potrava je velmi rozmanitá, zahrnuje živočišnou i rostlinnou potravu: šváb dokáže strávit téměř jakoukoliv potravu včetně např. velmi těžce stravitelné celulózy. To mu umožňuje široká enzymatická výbava jeho střeva, doplněná pomocnou činností mikroorganismů a jejich vlastními enzymy. U švába lze tedy předpokládat přítomnost všech běžných trávicích enzymů – amyláz, proteáz a lipáz – které tráví všechny základní živiny. Vlastní enzymatické trávení potravy švába probíhá ve středním střevě (mezenteron), které je na svém začátku rozvětveno na slepé výběžky zvané caeca. Jejich hlavní funkcí je zvětšení trávicí plochy a také objemové kapacity střeva. Předpokládá se, že trávení živin probíhá v obou částech středního střeva. Tento

poznatek plyne i z mých výsledků, je však zajímavé, že aktivita sledovaných enzymů nebyla v obou částech středního střeva stejná. Ukázalo se, že aktivita amyláz je v caeca vyšší než ve vlastním střevě, aktivita proteáz je zhruba stejná a aktivita lipáz je vyšší ve střevě. To naznačuje částečnou specializaci obou částí středního střeva. Relativně snadněji stravitelné glycidy se tráví převážně v caecách, u bílkovin se situace vyrovnaná a trávení strukturně složitějších tuků probíhá ve střevě. Je však nutno zdůraznit, že tato specializace je jen částečná, aktivitu všech tří sledovaných enzymů jsem zaznamenala u obou studovaných částí střeva.

Předpokládá se, že v řízení aktivity hmyzích střevních enzymů hrají důležitou roli hormony. Kromě běžných hmyzích hormonů se tohoto řízení pravděpodobně účastní i tkáňové hormony vylučované některými střevními buňkami (Audsley a Weaver, 2009) - přímých důkazů je však velmi málo nebo prakticky chybí. Nedávné výzkumy ukázaly, že do řízení činnosti střeva a trávení živin jsou zapojeny i adipokinetické hormony (AKH). Toto zapojení do trávicích funkcí u hmyzu bylo popsáno u plošnice ruměnice pospolné *Pyrrhocoris apterus* (Kodrík a kol., 2012; Vinokurov a kol., 2014), mouchy (masařky) *Sarcophaga crassipalpis* (Bil a kol., 2014) a také vyplynulo z mé předchozí práce na švábu americkém (Bodláková a kol., 2017). Z prací na ruměnici pospolné i masařce však nebylo jasné, zda je tato stimulace výsledkem přímého působení AKH na studované enzymy nebo nepřímá, tj. zajištěna třeba zvýšením příjmu potravy nebo stimulací pohybu střevního obsahu. V naší práci (Bodláková a kol., 2017) se však jednoznačně prokázalo, že AKH jsou zodpovědné za stimulaci střevní enzymatické aktivity, konkrétně amylázy. Dále jsme zjistili, že AKH ovlivňují aktivitu tohoto enzymu přímo nebo jednoduchou dráhou přímo ve střevě, protože stimulovaly amylázovou aktivitu in vitro, tedy za situace, kdy bylo střevo inkubováno mimo tělo, bez přítomnosti dalších orgánů. Je nutno zdůraznit, že zmíněná studie se týkala pouze amyláz a údaje o dalších enzymech chyběly. Nicméně ve výsledcích této SOČ práce, která naši publikaci Bodláková a kol. (2017) rozšiřuje a doplňuje ji, jsem jednoznačně prokázala, že stimulace činnosti trávicích enzymů prostřednictvím AKH není omezena jen na amylázy, ale týká se i činnosti proteáz a lipáz. Ukázala jsem také, že obě části středního střeva jsou na působení hormonů různě citlivé. Přestože, jak uvádím v prvním odstavci Diskuze, je celková amylázová aktivita v caeca výrazně vyšší než ve střevě, tak střevo bylo mnohem citlivější na stimulaci prostřednictvím AKH, takže po hormonálním ošetření se tento rozdíl snižoval na minimum. Je zajímavé, že to platí pro oba použité AKH (Peram-CAH-I i -CAH-II) i pro uspořádání pokusů in vivo a in vitro. Studium aktivity proteáz zase prokázalo, že caeca byly

prakticky necitlivé vůči působení AKH, takže se aktivita tohoto enzymu po hormonálním ošetření (in vivo i in vitro) až na jednu výjimku prakticky nezměnila. Je těžké rozhodnout, jestli to souvisí s aktivitou receptorů pro AKH nebo s enzymatickou výbavou buněk caeca. Střevní proteázy však reagovaly na AKH aplikaci dobře a jejich aktivita se zvýšila u všech použitých dávek. Také chování aktivity lipáz bylo odlišné od tendencí zjištěných u obou předešlých enzymů, i když na AKH aplikaci reagovaly jak caeca tak i vlastní střevo. Míra stimulace lipázové aktivity u obou těchto částí byla skoro stejná, takže se rozdíl v aktivitách zjištěný u kontrol zhruba zachovával i po ošetření AKH. Zdá se tedy, že adipokinetické hormony působí selektivně – pro každý enzym zvyšují aktivitu rozdílně.

Ze všech pokusů vyplynula jedna zajímavá skutečnost – stimulace enzymové aktivity u nejvyšší použité dávky (80 pmol) byla ve všech případech (s výjimkou aktivity proteáz u caeca, které ovšem na AKH ošetření nereagovaly) nižší než u dávky menší dávky (40 pmol). Tato skutečnost byly zaznamenána i u jiných aktivit řízených AKH. Např. u plošnice *P. apterus* bylo zjištěno, že injekce 10 pmol AKH (Pyrap-AKH) vyvolá maximální navýšení hladiny tuků v hemolymfě, ale u injekce 20 nebo 40 pmol bylo toto navýšení výrazně nižší (Kodrík et al., 2000). Dále, injekce 20 pmol AKH (Panbo-RPCH – *Pandalus borealis* red pigment concentrating hormone) do stínky obecné *Porcellio scaber*, vyvolala maximální zvýšení hladiny cukrů v hemolymfě, zatímco dávka 40 pmol hormonu vyvolala významně nižší odpověď (Zralá et al., 2010). Není úplně jasné, co stojí za touto skutečností, zdá se, že organismus je schopen reagovat ideálně na optimální dávky hormonů a že jejich vyšší i nižší už nejsou tak účinné.

Zajímavé by také bylo porovnat celkovou výši aktivity střevních enzymů u různých druhů hmyzu, která odráží typ a kvalitu přijímané potravy. To však není tak jednoduché, protože v různých pracích uvádí jejich autoři různé jednotky aktivity enzymů. Přesto se ukázalo, že např. u ruměnice pospolné *P. apterus* (Kodrík a kol., 2012; Vinokurov a kol., 2014) byla aktivita amylázy zhruba řádově nižší, než jsem naměřila u švába, což však není až tak překvapivé, protože tato plošnice se žíví převážně tukovou stravou z lipových semínek. To potvrzuje i aktivity lipázy v jejím střevě, která byla asi dvojnásobně vyšší, než jsem zjistila u švába.

I přes nedostatek literárních údajů je možné najít několik prací, které popisují vliv dalších hmyzích hormonů na činnost střeva. Např. právě u švába *P. americana* se zjistilo, že amylázy, ale i peptidázy jsou stimulovány hormonem CCAP (crustacean cardioactive peptide) (Sakai a kol., 2004), u švába *Diploptera punctata* zase hormon allatostatin stimuloval střevní amylázu

a invertázu (Fusé a kol., 1999). Již delší dobu je znám účinek hormonu TMOF (trypsin modulating oostatic factor), který u komárů spouští trávicí procesy bílkovin po naplnění střeva nasátou krví (Borovsky a kol., 1990).

6. ZÁVĚR

Práce studuje základní enzymy (amylázy, proteázy, lipázy) ve střevě švába amerického *P. americana* a popisuje zvýšení jejich aktivity po ošetření adipokinetickými hormony Peram-CAH-I a -CAH-II. Z naměřených výsledků plyne:

1. Všechny živiny - cukry, bílkoviny i tuky, se tráví v obou částech středního střeva – caecách i vlastním střevě, ale cukry přednostně v caecách a lipidy přednostně ve střevě.
2. Adipokinetické hormony stimulují aktivitu enzymů selektivně – na každý enzym působí rozdílně. Mezi oběma hormony ale nejsou podstatné rozdíly.
3. Adipokinetické hormony stimulují enzymy po aplikaci do těla švábu (in vivo), ale i při inkubaci střeva mimo tělo (in vitro), což naznačuje přímé hormonální řízení enzymatické aktivity.
4. Aktivita amyláz je vyšší v caecách než ve střevě. Po aplikaci adipokinetických hormonů se amylázová aktivita zvyšuje, toto zvýšení je vyšší ve střevě než caecách. Ke zvýšení amylázové aktivity v caecách in vitro dochází jen u nejvyšší dávky hormonů.
5. Aktivita střevních proteáz po aplikaci adipokinetických hormonů vzrůstá pouze ve střevě. K významnému zvýšení aktivity dochází u testů in vivo i in vitro.
6. Aktivita lipáz je ve střevě vyšší než v caecách. Po aplikaci adipokinetických hormonů dochází k nárůstu její aktivity ve střevě i v caecách, a to pro in vitro i in vivo testy.

7. LITERATURA

- Audsley N., Weaver R.J. (2009), Neuropeptides associated with the regulation of feeding in insects. *Gen. Comp. Endocrinol.* 162: 93-104.
- Barman T.E. (1969), *Enzyme handbook*. Springer-Verlag, Berlin.
- Bernfeld P. (1955), Amylases, a and b. In: Colowick, S.P., Kaplan, N.O. (Eds.), *Methods in Enzymology*. vol. 1. Academic Press, New York, pp. 149–158.
- Bil M., Broeckx V., Landuyt B., Huybrechts R. (2014), Differential peptidomics highlights adipokinetic hormone as key player in regulating digestion in anautogenous flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*. *Gen.Comp. Endocrinol.* 208: 49-56.
- Bodláková K., Jedlička P., Kodrík D. (2017), Adipokinetic hormones control amylase activity in the cockroach (*Periplaneta americana*) gut. *Insect Sci.* DOI: 10.1111/1744-7917.12314.
- Borovsky D., Carlson D. A., Griffin P.R., Shabanowitz J., Hunt D.F. (1990), Mosquito oostatic factor: a novel decapeptide modulating trypsin-like enzyme biosynthesis in the midgut. *FASEB J.* 4, 3015-3020.
- Fusé M., Zhang J. R., Partridge E., Nachman R. J., Orchard I., Bendena W.G., Tobe S.S. (1999), Effects of an allatostatin and a myosuppressin on midgut carbohydrate enzyme activity in the cockroach *Diploptera punctata*. *Peptides* 20: 1285-1293.
- Gäde G., Hoffmann K.H., Spring J.H. (1997), Hormonal regulation in insects: facts, gaps, and future directions. *Physiol. Rev.* 77: 963-1032.
- Karlson P. (1981), *Základy biochemie*. Academia, Praha, 3. České přepracované vydání.
- Kodrík D. (2008), Adipokinetic hormone functions that are not associated with insect flight. *Physiol. Entomol.* 33: 171-180

Kodrík D., Vinokurov K., Tomčala A., Socha R. (2012), The effect of adipokinetic hormone on midgut characteristics in *Pyrrhocoris apterus* L. (Heteroptera). *J. Insect Physiol.* 58: 194-204.

Kodrík D., Socha R., Šimek P., Zemek R., Goldsworthy G.J. (2000), A new member of the AKH/RPCH family that stimulates locomotory activity in the firebug, *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30: 489-498.

Lehane M.J., Billingsley P.F. (1996), *Biology of insect midgut*. Chapman & Hall, London, UK.

Roberts I.M. (1985), Hydrolysis of 4-methylumbelliferyl butyrate: a convenient and sensitive fluorescent assay for lipase activity. *Lipids* 20: 243-247.

Sakai T., Satake H., Minakata H., Takeda M. (2004), Characterization of crustacean cardioactive peptide as a novel insect midgut factor: isolation, localization, and stimulation of α -amylase activity and gut contraction. *Endocrinology* 145: 5671-5678.

Scarborough R. M., Jamieson G. C., Kalish F., Kramer J. S., McEnroe G. A., Miller C. A. and Schooley D. (1984), Isolation and primary structure of two peptides with cardioacceleratory and hyperglycemic activity from the corpora cardiaca of *Periplaneta americana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 5575–5579.

Tamaki F.K., Pimentel A.C., Dias A.B., Cardoso C., Ribeiro A.F., Ferreira C., Terra W.R. (2014), Physiology of digestion and the molecular characterization of the major digestive enzymes from *Periplaneta americana*. *J. Insect Physiol.* 70: 22-35.

Vinokurov K., Bednářová A., Tomčala A., Stašková T., Krishnan N., Kodrík D. (2014), Role of adipokinetic hormone in stimulation of salivary gland activities: the fire bug *Pyrrhocoris apterus* L. (Heteroptera) as a model species. *J. Insect Physiol.* 60: 58-67.

Vodrážka Z. (1999), *Biochemie*. Academia, Praha, 2. opravené vydání

Zralá J., Kodrík D., Zahradníčková H., Zemek R., Socha R. (2010), A novel function of red pigment-concentrating hormone in crustaceans: *Porcellio scaber* (Isopoda) as a model species. Gen. Comp. Endocrinol. 166: 330-336.