

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Vliv adipokinetického hormonu na působení jedu
z vosičky, *Habrobracon hebetor*, ve svalové tkáni
octomilky, *Drosophila melanogaster***

Bakalářská práce

Šárka Podlahová

Školitelka: Mgr. Hana Sehadová, Ph.D.

Konzultant: prof. RNDr. Dalibor Kodrík, CSc.

České Budějovice 2019

Podlahová, Š., 2019: Vliv adipokinetického hormonu na působení jedu z vosičky, *Habrobracon hebetor*, ve svalové tkáni octomilky, *Drosophila melanogaster* [Influence of adipokinetic hormone in the muscle tissue of *Drosophila melanogaster* after treatment with a venom of the wasp *Habrobracon hebetor*. Bc. Thesis, in Czech] – 40 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Adipokinetic hormone (AKH) delays or reduces neuromuscular paralysis caused by the venom of the parasitic wasp *Habrobracon hebetor*, however the associated mechanism is not known yet. This thesis describes in detail the technique of preparation of semithin and ultrathin sections analyzed by a transmission electron microscopy that enabled detailed observation of changes in muscular ultrastructure of the *Drosophila melanogaster* thorax after the wasp venom and AKH treatments. The results revealed that the wasp venom induced significant changes in the ultrastructure of myofibrils and mitochondria; however, the changes were reduced after co-application with AKH. AKH itself did not affect organization of muscle fibres but elicited vacuolization in mitochondria. Furthermore the wasp venom treatment led to significant prolongation of sarcomeres.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

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

Šárka Podlahová

Poděkování

Ráda bych poděkovala mé školitelce Mgr. Haně Sehadové, Ph.D. za pečlivé vedení, vstřícnost, ochotu a čas, který věnovala mé práci a za asistenci při zpracování pořízené fotodokumentace. Především chci poděkovat Jitce Pfliegerové za metodické vedení mé práce a za trpělivost a asistenci při získávání zkušeností se zhotovením polotenkých a ultratenkých řezů. Moje poděkování patří i prof. RNDr. Daliboru Kodríkovi, CSc. za spolupráci, odborné rady a pomoc při analýze dat. V neposlední řadě děkuji zaměstnancům Laboratoře elektronové mikroskopie Parazitologického ústavu Biologického centra Akademie věd ČR za poskytnutí vybavení a cenných rad jmenovitě Mgr. Martině Tesařové a Petře Masařové a také celému kolektivu Střediska mikroskopie a histologie Entomologického ústavu Biologického centra Akademie věd ČR za poskytnutí prostor a přátelskou atmosféru.

Obsah

1	Úvod.....	1
1.1	Adipokinetické hormony	1
1.1.1	Struktura adipokinetických hormonů.....	1
1.1.2	Funkce adipokinetických hormonů.....	2
1.2	Charakterizace jedu parazitické vosičky	4
1.3	Příčně pruhované svalstvo u hmyzu	5
1.3.1	Struktura svalu	5
1.3.2	Svalová kontrakce	7
1.3.3	Mitochondrie.....	7
1.3.4	Thorakální svaly	8
1.4	Elektronová mikroskopie.....	9
1.4.1	Příprava vzorků pro ultramikrotomii	11
2	Cíle práce	14
3	Materiál a metody	15
3.1	Laboratorní zvířata	15
3.2	Pitva a ošetření tkáně	15
3.3	Fixace a zalévání materiálu pro potřeby TEM	15
3.4	Zhotovení polotenkých řezů	17
3.4.1	Příprava skleněného nože	17
3.4.2	Trimování.....	17
3.4.3	Krájení materiálu a barvení polotenkých řezů	18
3.4.4	Zhotovení trvalých preparátů a dokumentace polotenkých řezů	19
3.5	Zhotovení ultratenkých řezů	19
3.6	Kontrastování ultratenkých řezů.....	20
3.7	Pouhlikování ultratenkých řezů	21
3.8	Prohlížení a dokumentace ultratenkých řezů	21

3.9	Měření délky sarkomer	22
4	Výsledky	23
4.1	Analýza polotenkých řezů thoraxu octomilky	23
4.2	Analýza ultratenkých řezů thoraxu octomilky	24
4.3	Srovnání délky sarkomer u testovaných skupin	27
5	Diskuze	28
6	Závěr	31
7	Seznam použitých zkratk	32
8	Seznam použité literatury	34
9	Přílohy	38
Příloha 1	Octomilka obecná, <i>Drosophila melanogaster</i>	38
	Popis modelového organismu	38
	Příprava potravy	39
Příloha 2	Příprava použitých roztoků	40

1 Úvod

1.1 Adipokinetické hormony

Centrem endokrinní soustavy hmyzu jsou neurosekretorické buňky mozku, které jsou nervovými dráhami propojeny s endokrinními žlázami *corpora cardiaca* (CC) a *corpora allata* (CA). Tento komplex je přirovnáván k hypotalamo-hypofyzární soustavě obratlovců. Endokrinní soustavu hmyzu dále tvoří prothorakální žlázy, které se nacházejí v prvním hrudním článku – prothoraxu. Nedílnou součástí jsou také neurosekretorické buňky ostatních ganglií, endokrinní buňky střeva, epitracheální buňky a pohlavní orgány – gonády. Přestože se hormonální soustava hmyzu v řadě rysů shoduje s endokrinní soustavou obratlovců, na rozdíl od nich produkuje převážně neurohormony a málo pravých hormonů. Hormonální soustava hmyzu zahrnuje desítky až stovky hormonů, které je možné rozdělit na tři skupiny – ekdysteroidy, juvenilní hormony a peptidické neurohormony, které řídí prakticky všechny aspekty hmyzího života (Kodrík 2014).

Mezi peptidické neurohormony se řadí i adipokinetické hormony (AKH). Jsou syntetizovány, ukládány a uvolňovány neurosekretorickými buňkami žlázy CC (Gäde et al. 1997). Studie na octomilce, *Drosophila melanogaster*, ukazují že CC je jedinou tkání produkující tento hormon (Lee a Park 2004). Zatímco u plošnice, *Pyrrhocoris apterus*, se AKH nachází kromě CC i v řadě neuronů centrálního mozku (Kodrík et al. 2015). AKH se vyskytují u všech významných hmyzích řádů, je známo 47 různých forem. Například u druhu saranče stěhovavé, *Locusta migratoria*, jsou popsány 3 různé hormony *Locmi*-AKH-I–III, přičemž *Locmi*-AKH-I byl první sekvenovaný hmyzí peptid (Stone et al. 1976, Gäde 2009). U *D. melanogaster* existuje jeden typ hormonu nazvaný *Drome*-AKH (Schaffer et al. 1990).

1.1.1 Struktura adipokinetických hormonů

Adipokinetické hormony jsou součástí rodiny hormonů anglicky označených jako adipokinetické hormony/červený pigment koncentrující hormony (AKH/RPCH). Skládají se z 8-10 aminokyselin (okta-, nona-, deka-peptidy), N konec je blokován pyroglutamovou kyselinou a C konec je blokován amidem (NH₂). Na čtvrté pozici v sekvenci je stabilně aromatický fenylalanin, na osmé pozici je tryptofan (Gäde a Goldsworthy 2003). Aminokyseliny na dalších místech v sekvenci se odlišují podle jednotlivých druhů adipokinetických hormonů. Sekvence AKH u octomilky je zapsána takto: pGlu-Leu-Thr-Phe-Ser-Pro-Asp-Trp-NH₂ neboli pQLTFSPDWa (Schaffer et al. 1990).

1.1.2 Funkce adipokinetických hormonů

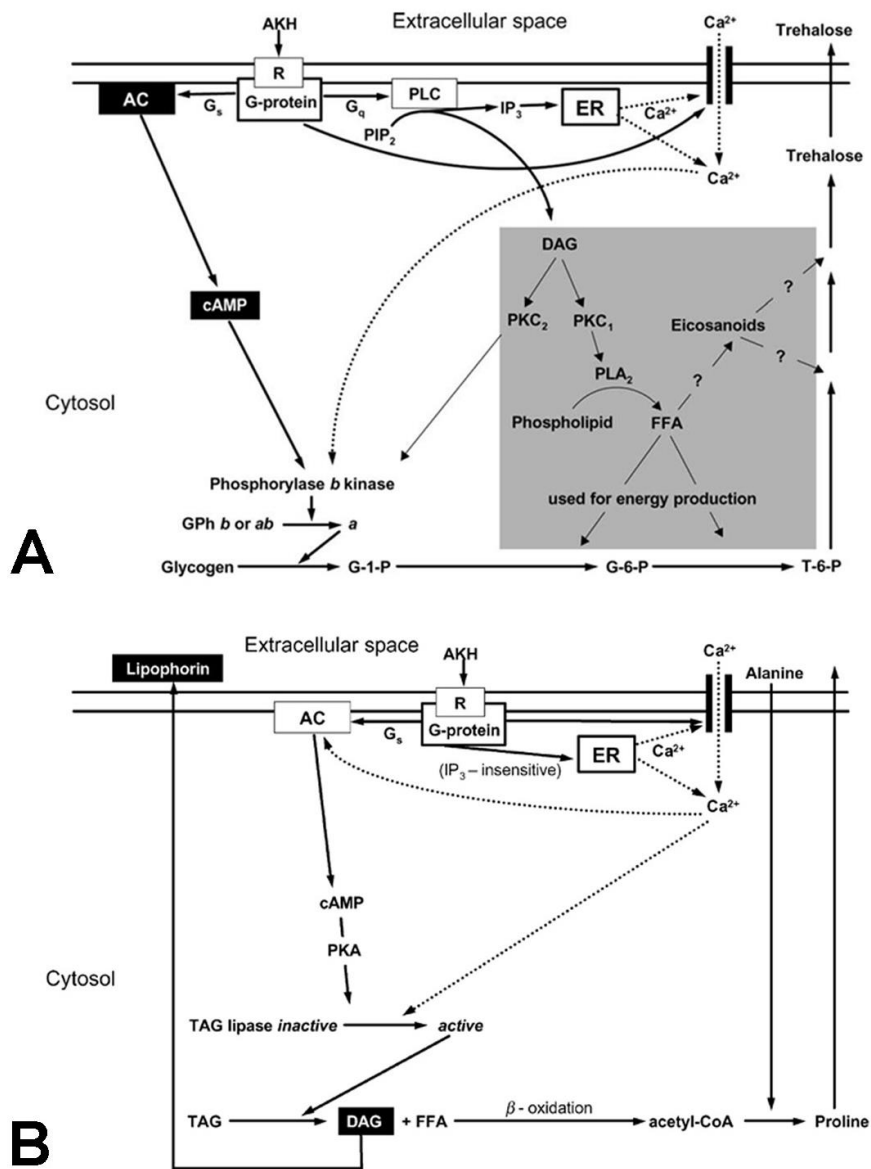
Adipokinetické hormony ovlivňují především hmyzí metabolismus, proto je jejich hlavním cílovým orgánem tukové těleso, jež funkčně odpovídá játrům a tukové tkáni obratlovců a jehož buňky obsahují energetické zásoby. AKH se obvykle označují jako stresové hormony, jelikož v tukovém tělese podporují katabolické reakce, jako je mobilizace zásob lipidů, sacharidů nebo aminokyselin, a tím zajišťují přísun energie pro antistresovou reakci (Lee a Park 2004). Zároveň jsou inhibovány anabolické reakce zahrnující syntézu proteinů, mastných kyselin a RNA v tukovém tělese (Nässel et al. 2010).

Po uvolnění z CC putují AKH hemolymfou k tukovému tělesu. Kvůli své chemické povaze však nemohou pronikat dovnitř jeho buněk, proto se váží na receptory spojené s G-proteiny. V tukovém tělese tyto receptory následně aktivují příslušné enzymy, fosfolipázu C, nebo adenylát cyklázu, které spouští příslušné metabolické dráhy (Obr. 1).

Z funkčního hlediska se AKH podobají lidskému glukagonu, hormonu produkovaného alfa buňkami pankreatu u obratlovců. Hlavní úlohou glukagonu je, stejně jako u AKH, mobilizace energetických zásob a podíl na kontrole hladiny glukózy v krvi (Kodrík 2008). V hemolymfě hmyzu AKH zvyšuje hladinu trehalózy, neredukujícího disacharidu tvořeného dvěma molekulami glukózy, hlavního krevního cukru hmyzu. Na základě této funkce je AKH považován za peptid příbuzný hypertrehalosemickému hormonu (HTH – hypertrehalosemic hormone) (Lee a Park 2004).

AKH zajišťují celou řadu dalších reakcí, které základní metabolickou roli doplňují a podílí se tak na eliminaci nebo snížení dopadu stresu na organismus. Jedná se o tzv. pleiotropní funkci, jejíž účinky zahrnují zvýšení činnosti srdce, aktivaci pohybové soustavy, zvýšení svalového tonu, imunitní odpovědi, aktivaci antioxidačních mechanismů (ochrana proti oxidačnímu stresu) (Gäde et al. 1997, Kodrík 2008) a zvýšení příjmu potravy a trávicích procesů ve střevě (Kodrík et al. 2012). Posledně zmiňovaný účinek však už nepatří k akutní antistresové reakci. Projevuje se za delší dobu od aplikace hormonu (po více než 24 hodinách) a zajišťuje tak doplnění spotřebovaných zásob energie.

Zajímavá role AKH byla popsána u hladovějících octomilek (Lee a Park 2004). Funkce AKH zde spočívá v navození hyperaktivního chování jako odpověď na hladovění. Slídění po potravě při vyčerpání energetických zásob zvyšuje pohybovou aktivitu jedince: jedná se o zoufalou snahu získat potravu (což je klíč k přežití). Pokusy ukázaly, že potlačení hyperaktivního chování během hladovění (tudíž pomalejší katabolismus omezených zásob)



Obr. 1: Metabolické dráhy vyvolané vazbou AKH na receptor podle Gäde a Auerswald (2003).

(A) Dráha vedoucí ke zvýšení hladiny trehalózy v hemolymfě. Fosfolipáza C (PLC) vyvolá uvolnění Ca²⁺ iontů z endoplazmatického retikula (ER) pomocí aktivace inositol trifosfátu (IP₃). Zároveň vzniká diacylglycerol (DAG), který spouští kinázovou kaskádu aktivující glykogen fosforylázu za účasti Ca²⁺ iontů. Vzniká glukóza-1-fosfát (G-1-P), který se mění na trehalózu. U sarančat je glykogen fosforyláza (GPh) aktivovaná přes dráhu zahrnující adenylát cyklázu (AC) a syntézu cyklického AMP (cAMP).

(B) Dráha vedoucí ke zvýšení hladiny prolinu v hemolymfě. V případě aktivace lipidů u sarančat a lišajů nebo prolinu u brouků působí cAMP na protein kinázu A (PKA), která za účasti Ca²⁺ iontů aktivuje triacylglycerol (TAG) lipázu, což vede k produkci DAG nebo volných mastných kyselin (FFA) za vzniku prolinu. CoA, koenzym A; G-6-P, glukóza-6-fosfát; PIP₂, fosfatidylinositol bisfosfát; PKC, protein kináza C; R, receptor; T-6-P, trehalóza-6-fosfát. Bílá písmena v černém poli ukazují dráhu zjištěnou u sarančat, šedý rámeček značí dráhu zjištěnou u švábů.

u AKH-deficientních octomilek prodlužuje jejich přežití. Bez AKH jsou mouchy hypoaktivní a dokáží přežít bez potravy o 50 % déle.

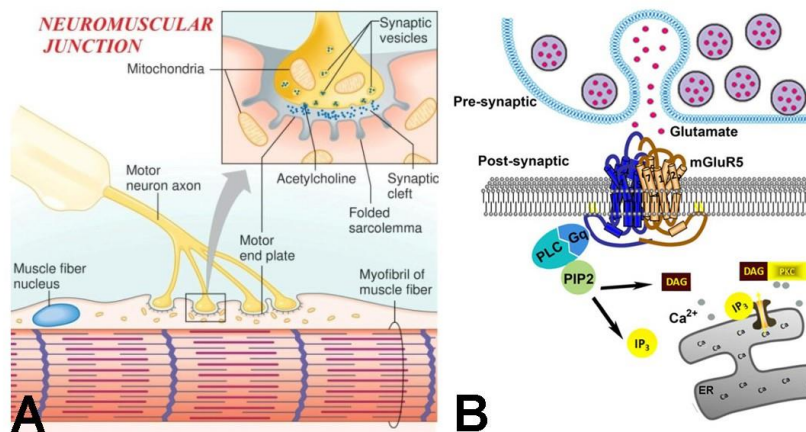
Současné výsledky ukazují, že AKH dokáže zmírnit působení vosičkového jedu na nervově svalovou paralýzu tkáně u ploštice ruměnice pospolné, *P. apterus* (Shaik et al. 2017). Studie ultrastruktury svalové tkáně odhalily zásadní rozdíly v uspořádání myofibril a přilehlých mitochondrií v tkáních ošetřených vosičkovým jedem (Kodrík nepublikováno). Při aplikaci jedu společně s AKH však byly tyto změny významně potlačeny. Z těchto poznatků vychází tato práce, která se zaměřuje na studium účinků vosičkového jedu a AKH na svalovou tkáň octomilky, *D. melanogaster*. Rozsáhlý genetický základ a znalost mechanismů kontrolujících rozmanité fyziologické procesy tohoto modelového organismu mohou přispět k poodhalení mechanismu zodpovědného za vyvolání nervosvalové paralýzy a role AKH při tomto procesu.

1.2 Charakterizace jedu parazitické vosičky

Vosička *Habrobracon hebetor* z řádu Hymenoptera patří mezi ektoparazitoidní druh, který klade v rozmezí 3 až 20 vajíček na povrch těla hostitelské larvy nejčastěji motýla rodu *Ephestia*, *Plodia* nebo *Galleria*. Z vajíček se vylíhnou larvy, které parazitují na kutikule hostitele (Kryukova et al. 2011). Pro zajištění optimálních podmínek vývoje svého potomstva se u *H. hebetor* vyvinula schopnost paralyzovat hostitele pomocí svého jedu.

Mechanismus paralytické aktivity není zcela objasněn, avšak již bylo zjištěno, že je zprostředkovan třemi částečně charakterizovanými proteiny, které blokují receptory na presynaptické membráně nervosvalového spojení a tím inhibují exocytózu glutamátu z presynaptických váčků (Pennacchio a Strand 2006). Jedním typem glutamátových receptorů na postsynaptické membráně je receptor spřažený s G-proteinem (Obr. 2). Navázání příslušného ligandu vede k uvolnění vápníku z endoplazmatického retikula přes aktivaci fosfolipázy C, tj. stejnou cestou jako u receptorů AKH (Li et al. 2017).

Svým jedem způsobuje vosička nervosvalovou paralýzu a zastavení vývoje hostitele. Pokusy na larvě zavíječe voskového, *Galleria mellonella*, ukázaly, že po injekci jedu se larva snaží hýbat, ale po minutě zůstane paralyzovaná. Larva přestává dále reagovat na hmatové a elektrické podráždění. Jak postupně dochází k celkové paralýze, jsou detekovány nepravidelné a nekoordinované svalové fibrilace, které se však následně vytrácejí. Z celého těla zůstává nedotčeno pouze srdce a střevo. Srdce začíná zpomalovat po několika dnech v důsledku oslabení těla. Studie ukazuje, že jed vosičky je velmi účinný (Beard 1952).



Obr. 2: Přenos vzruchu na nervosvalové ploténce. (A) Pohled na synaptická zakončení nervových vláken na svalu s detailním záběrem na přenos neurotransmiteru (v tomto případě acetylcholinu) na receptory ve svalovém vlákně. Převzato z: <http://www.karunayoga.in/neuromuscular-junction-myoneural-junction/>. (B) Signální dráha glutamátového receptoru aktivující produkci vápníku z endoplazmatického retikula (ER). PLC, fosfolipáza C; Gq, G-protein; PIP₂, fosfatidylinositol bisfosfát; IP₃, inositol trifosfát; PKC, protein kináza C; DAG, diacylglycerol; mGluR5, glutamátový receptor. Upraveno podle: Li et al. (2017).

Ve studii zkoumající účinek AKH na nervosvalovou paralýzu vosičkovým jedem u živé plošnice ruměnice pospolné, *P. apterus*, bylo zjištěno, že do 15 hodin od aplikace jedu odpovídající ekvivalentu 0,2 jedové žlázy zůstali všichni jedinci paralyzováni. Současně s aplikací 80 pmol hormonu *Pyrap*-AKH se paralýza značně zpomalila. Všechny plošnice s aplikací jedu a *Pyrap*-AKH byly paralyzovány za 20 hodin. To dokazuje, že adipokinetický hormon zatím neznámým mechanismem dokáže zpozdit nebo dokonce zmírnit paralýzu u ploštic (Shaik et al. 2017).

1.3 Příčně pruhované svalstvo u hmyzu

1.3.1 Struktura svalu

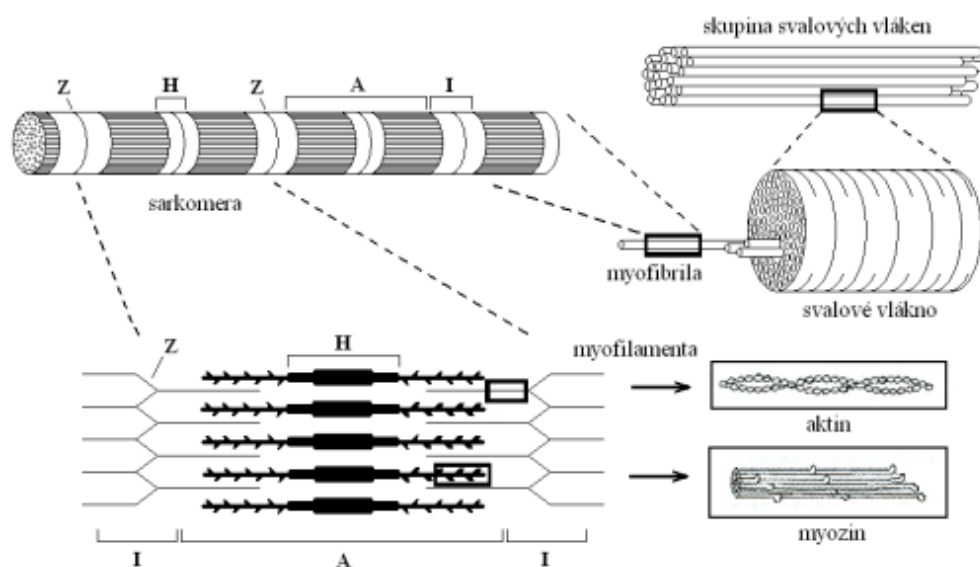
Na rozdíl od obratlovců má hmyz jen jeden typ svaloviny, a to příčně pruhovanou. Hmyzí svaly se strukturně skládají ze svalových jednotek (malé svaly jsou tvořeny pouze jednou jednotkou), které jsou obaleny tracheolizovanou membránou a inervovány jedním větveným axonem (Kodrík 2004). Svalové jednotky se sestávají ze svalových vláken (tj. svalových buněk), která jsou složená z myofibril tvořených aktinem a myozinem.

Svalové vlákno, základní strukturní jednotka, je mnohojaderná svalová buňka vzniklá splynutím myoblastů. U hmyzu se prezentuje několik typů svalových vláken odlišujících se v počtu a umístění jader. Na povrchu svalového vlákna je sarkolema (buněčná membrána),

uvnitř se nachází sarkoplazma s vysokým obsahem mitochondrií (sarkozómů), které zajišťují přísun energie pro činnost svalu ve formě ATP. Jedno svalové vlákno je složeno z několika set myofibril, základních funkčních jednotek. Myofibrila obsahuje kontraktilní bílkoviny aktin a myozin a dále bílkoviny troponin a tropomyozin (Kodrík 2004).

Aktin je tenké filamentum, které se skládá z globulárních aktinových monomerů polymerizujících ve dvě vlákna, která se vzájemně obtáčí a tvoří šroubovici. Myozin je tlusté filamentum skládající se ze dvou vzájemně se obtáčejících α -helixů, které na jednom konci tvoří hlavy. Jedná se o tzv. dvouhlavé oblasti, které reagují s aktinem za vzniku můstku. Troponin a tropomyozin v klidovém stavu blokují vazbu aktin-myozin. Vazba se odblokuje v přítomnosti Ca^{2+} iontů, které mění konformaci blokujících bílkovin (Cooper 2000).

Základní funkční jednotkou myofibrily je sarkomera (Obr. 3), ve které vzniká svalový stah. Ta je složená z aktinových a myozinových úseků, které se do sebe při svalové kontrakci zasouvají a zkracují tak sarkomeru. Okraje sarkomery tvoří Z-linie, kde se aktinová vlákna ukotvují na α -aktinin. Aktinová filamenta protínající Z-linie tvoří tzv. I-pruhy (izotropní), které jsou jednolomné. Dále sarkomera obsahuje A-pruh (anizotropní), dvojlomný pruh tvořený myozinem. Uprostřed A-pruhu se nachází H-oblast obsahující příčné myozinové můstky tvořené H-meromyozinem. Konce můstků obsahují hlavice, které se váží na aktin a mají ATP-ázovou aktivitu. Střed H-oblasti se označuje jako M-linie.



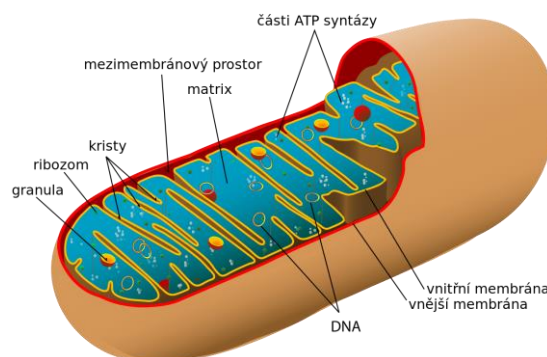
Obr. 3: Schéma příčně pruhovaného svalového vlákna a struktura myofibrily. Z, Z-linie oddělující jednotlivé sarkomery; H, H-oblast s M-linií uprostřed; A, A-pruh tvořený myozinem; I, I-pruh tvořený aktinem. Převzato z: <https://www.kme.zcu.cz/kmet/bio/svstavba.php>.

1.3.2 Svalová kontrakce

U hmyzu je svalové vlákno inervováno polyneuronálně, jelikož svalové membrány vykazují sníženou schopnost generovat akční potenciál. Proto větvený axon na jednom vlákně dráždí více míst. Svalová kontrakce probíhá stejně jako u obratlovců, avšak svaly jsou zde upínány na exoskelet. Podnět pro stah se šíří motorickým neuronem až na nervosvalové ploténky lokalizované na svalových vlákních. To vyvolá uvolnění neurotransmiteru, kterým je u hmyzu pravděpodobně L-glutamát a vzniká akční potenciál, který stimuluje uvolnění Ca^{2+} iontů ze sarkoplazmatického retikula. Sled několika reakcí vede k interakci svalových bílkovin a uskutečnění svalové kontrakce. Relaxace je realizována snížením hladiny Ca^{2+} iontů v cytoplazmě svalových buněk a doprovází ji spotřeba ATP (Kodřík 2004).

1.3.3 Mitochondrie

Energie pro práci svalů ve formě ATP je dodávána mitochondriemi (Obr. 4). Tyto semiautonómny organely mají dvě membrány a vlastní DNA. Mitochondrie jsou v buňkách lokalizované převážně v místech vysoké potřeby ATP. Jejich vnější pórovitá membrána obsahuje transportní protein porin, který propouští látky dovnitř do určité velikosti. Vnitřní membrána, jejíž plocha je zvětšená díky četným záhybům, tzv. kristám, je klíčová pro získání ATP. Obsahuje membránové transportní proteiny, kterými prochází např. pyruvát a mastné kyseliny do matrix. To je vnitřek mitochondrie, bohatý na enzymy účastnící se citrátového cyklu, jehož hlavním produktem jsou elektronové přenašeče (např. NADH), které transportují elektrony na proteinové komplexy ve vnitřní membráně. Vedle proteinových komplexů se ve vnitřní membráně nachází i ATP-syntáza, která díky procházejícím protonům z mezimembránového prostoru do matrix produkuje ATP. Tento proces, kde je



Obr. 4: Schématické znázornění stavby mitochondrie. Převzato z:

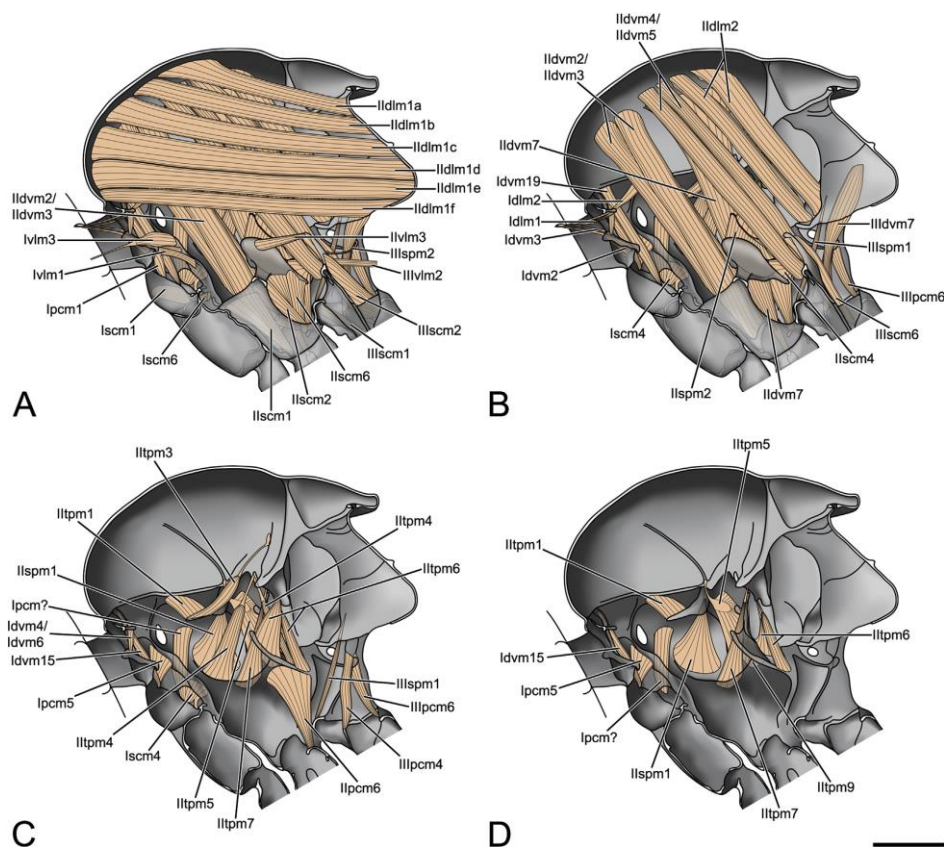
https://cs.wikipedia.org/wiki/Mitochondrie#/media/File:Animal_mitochondrion_diagram_cs.svg.

energie elektronů využita k tvorbě ATP, se nazývá oxidativní fosforylace. Díky vlastní DNA, může v mitochondriích probíhat i transkripce a translace za přítomnosti vlastních ribozómů, které umožňují syntetizovat některé ze svých proteinů (Cooper 2000).

Mitochondrie jsou orgány, které neustále fúzí a opět se rozestupují. Tyto procesy jsou souhrnně označovány jako dynamika mitochondrií. Narušení této dynamiky má vliv na bioenergetické zásobování a přispívá k neurodegenerativním změnám (Westermann 2010).

1.3.4 Thorakální svaly

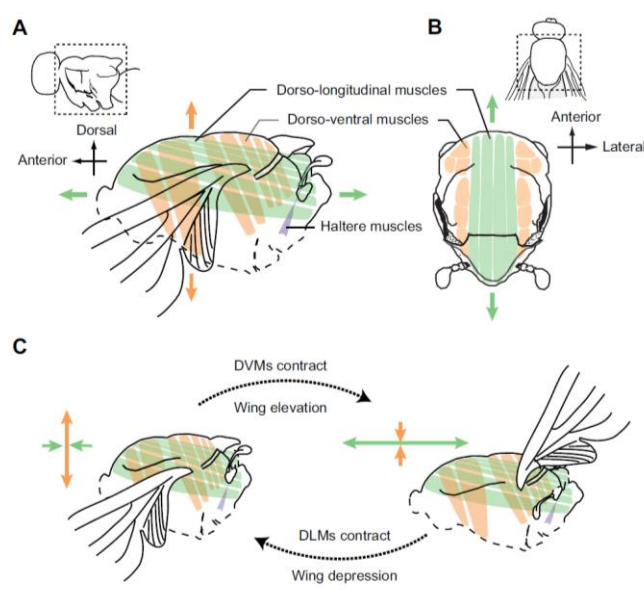
Hrud' hmyzu se skládá ze tří článků: předohrudí (prothorax), středohrudí (mesothorax) a zadohrudí (metathorax). Každý z nich nese jeden pár končetin, středohrud' a zadohrud' navíc ještě jeden pár křídel. Do thoraxu ústí svaly z končetin sloužící převážně k chůzi a skákání, ale převážnou část thoraxu tvoří svaly letové (Obr. 5).



Obr. 5: Svalovina thoraxu u *D. melanogaster*. (A) Všechny svaly, (B–D) postupné odstraňování horních svalových vrstev. Dorzolongitudinální svaly (dlm), dorzoventrální svaly (dvm), pleurocoxální svaly (pcm), ventrolongitudinální svaly (vlm), sternocoxální svaly (scm), tergopleurální svaly (tpm), sternopleurální svaly (spm). Římské číslice před zkratkami svalů označují umístění svalu v předním (I), středním (II) a zadním (III) thoraxu. Měřítko: 200 μ m. Převzato z: Fabian et al. (2016).

Létací svaly hmyzu jsou dvojího typu: přímé a nepřímé. Přímé létací svaly se připojují přímo na křídla, jsou synchronního typu a určují úhel křídel při letu. Vyskytují se většinou u primitivních řádů hmyzu. Je to běžný druh svaloviny, kde jeden impuls vyvolá svalový stah (Baker 2005).

Pokročilejší řády hmyzu, včetně řádu Diptera, mají nepřímé létací svaly, které jsou asynchronního typu, kdy jeden impuls vyvolá několik svalových stahů. Asynchronní uspořádání umožňuje až stovky stahů díky klikovému mechanismu (Kodrík 2004). Nepřímá svalovina není upevněna přímo ke křídům, ale upíná se na stěnu thoraxu, který deformuje a tím vyvolává pohyb křídel. Nepřímé létací svaly (Obr. 6) se klasifikují na dorzoventrální (příčné) a dorzolongitudinální (podélné). Svaly působí antagonisticky, dorzoventrální při stahu zdvihají křídla, dorzolongitudinální naopak při stahu působí pohyb křídel dolů (Vigoreaux 2001). Rotační pohyby křídel v podélné ose umožňují svaly pleurální (Kodrík 2004).



Obr. 6: Nepřímé asynchronní létací svaly v thoraxu. (A) Boční pohled na thorax, (B) hřbetní část thoraxu, (C) působení svalových antagonistů při kontrakci a relaxaci: zeleně – dorzolongitudinální svaly (DLMs), oranžově – dorzoventrální svaly (DVMs). Převzato z: Deora et al. (2017).

1.4 Elektronová mikroskopie

Předkládaná práce studuje účinek vosičkového jedu na svalovou tkáň a zmírnění jeho působení po aplikaci AKH na úrovni ultrastruktury, kterou lze studovat pomocí elektronové mikroskopie. Ta dovoluje zkoumat speciálně upravené preparáty s maximálním užitečným zvětšením 10^6 . Jak již název napovídá, tento typ mikroskopie pracuje s proudem záporně

nabitých elektronů ve vakuu. Záporný náboj umožňuje urychlovat elektrony elektrickým napětím a tím získat kinetickou energii potřebnou k vizualizaci zkoumaného objektu (Nebesářová 2001).

Elektronová mikroskopie se rozděluje na dva základní typy transmisní a skenovací. V obou případech je vzorek vložen do vakuové komory, kde je vystaven svazku elektronů. Skenovací (rastrovací) elektronovou mikroskopií (SEM), při které vzniká obraz pomocí odražených a sekundárních elektronů, mohou být pozorovány pouze dokonale vysušené vzorky s pokoveným, obvykle pozlaceným, povrchem. To umožňuje velmi detailně analyzovat povrchovou strukturu objektů, které dosahují velikosti i několika cm. Velikost preparátu je omezena objemem vakuové komory. Běžné urychlovací napětí je 10 kV (Kubínek 2011).

U transmisní (prozařovací) elektronové mikroskopie (TEM) prochází proud elektronů vzorkem za vzniku řady interakcí, které zahrnují pružný a nepružný rozptyl elektronů. Obraz se tvoří díky amplitudovému a fázovému kontrastu (Nebesářová 2001, Karlík 2011). Do vakuové komory mikroskopu se preparáty vkládají na nosných sítkách např. z mědi ve speciálním držáku. Měď je vhodná pro výrobu sítěk, jelikož je diamagnetickým materiálem, který neovlivňuje procházející elektrony (Kubínek 2011). Obraz je promítán na stínítko, umístěné ve spodní části tubusu mikroskopu, pokryté krystalky ZnS, které převedou informaci z elektronů do viditelného světla. Záznam obrazu byl dříve pořizován na fotografické negativy, v současné době jsou využívány CCD kamery nebo digitální desky přenášející obraz do elektronické podoby. Urychlovací napětí u TEM závisí na typu mikroskopu, dosahuje hodnot v rozmezí 40–400 kV (Karlík 2011). Jeden konkrétní typ transmisního mikroskopu je zobrazen na Obr. 7.

Vzorky biologických materiálů zkoumaných touto zobrazovací metodou se rozdělují do třech hlavních skupin – totální preparáty, repliky a ultratenké řezy. Totální preparáty se v mikroskopu prohlížejí celé, jedná se např. o suspenze virů, bakterií nebo o izolované buněčné organely. Repliky jsou otisky reliéfu objektu do tenkého filmu transparentního pro elektrony např. uhlík, formvar (Karlík 2011).



Obr. 7: Transmisní elektronový mikroskop JEOL JEM-1010

Maximální tloušťka biologického preparátu u základní TEM je 100 nm, aby byl vzorek dobře průchodný pro elektronový paprsek. U silnějšího objektu je obraz zatížen značnou chromatickou vadou a není možné ho zaostřit (Karlík 2011). Větší objekty se proto zpracovávají ultramikrotomií na ultratenké řezy. Tato metoda vyžaduje specifickou přípravu objektů zahrnující odběr tkáně, fixaci preparátu, odvodnění, zalití do pryskyřice, krájení na ultramikrotomu, kontrastování a pouhlikování řezů.

1.4.1 Příprava vzorků pro ultramikrotomii

Aby pozorovaná struktura vzorku co nejlépe odpovídala živému stavu, je potřeba vzorek nafilovat. Fixace slouží k rychlému usmrcení buněk a zablokování degradačních procesů. Konkrétně se jedná o schopnost zastavit průběh životních a poté postmortálních procesů ve tkáni. Fixace musí být zároveň šetrná, aby se nenarušila struktura buněk. Fixační tekutina se skládá z fixačního činidla v pufovacím roztoku, který je přizpůsobený osmolalitě a pH tkáně (Karlík 2011).

Jako primární fixační činidlo se obvykle užívá glutaraldehyd (GA), aldehyd kyseliny glutarové, který rychle proniká do tkání. GA dobře a ireversibilně reaguje s proteiny, glykogenem a DNA, hůře reaguje s lipidy, některými polysacharidy, glykoproteiny a s glykosaminoglykany. Jako sekundární fixace slouží oxid osmičelý (OsO_4), který zvyšuje kontrast tkání. Nepoužívá se jako primární fixační činidlo, jelikož porušuje bílkoviny a s některými částmi buněk (cytoplazma, chromatin, mikrotubuly) ani nereaguje.

Odvodnění vzorků je dalším krokem v přípravě pro TEM. Voda musí být nahrazena dehydratačním činidlem, nejčastěji etanolem nebo acetonem, který je přímo mísitelný se všemi dostupnými pryskyřicemi a způsobuje menší změny ve velikosti tkáně než etanol (Kubínek et al. 2011).

Zalévání materiálu do polymerní pryskyřice (infiltrace) se provádí z důvodu zpevnění pro následné krájení. Běžně se používají epoxidové pryskyřice, látky s viskozitou odpovídající hustšímu sirupu, které jsou schopny při vyšší teplotě (60 °C) polymerizace (tvorba makromolekulárních sloučenin spojením monomerů do řetězce). Infiltrace se provádí tak, že vzorek projde více roztoky pryskyřice s acetonem, ve kterých postupně roste poměr pryskyřice. K zalévání vzorků a následné polymerizaci bločků se používají formy ze silikonu, ve kterých pryskyřice vytvoří skelně tvrdý bloček, který je připraven pro krájení.

Krájení se provádí na přístroji zvaném ultramikrotom (Obr. 8) pomocí skleněného nebo diamantového nože. Zařízení obsahuje vahadlo, které vykonává kývavý a posuvný pohyb při krájení směrem k noži. Na vahadlo se upevňuje držák s bločkem otrimovaným do komolé pyramidy. Na kvalitu řezů má vliv kvalita ostří nože, seřízení ultramikrotomu (úhel nože k bločku, rychlost řezání), charakter zalitého materiálu, tvar a řezná plocha pyramidy a tekutina ve vaničce. Vzorky se krájí na polotenké (obvyklá tloušťka 0,5–1 μm) a ultratenké řezy (optimální tloušťka 70 nm). Polotenké řezy se barví toluidinovou modří, která se řadí mezi bazická barviva. Obarvené polotenké řezy se prohlíží na optickém mikroskopu a lze na nich rozlišit pouze základní buněčné komponenty (cytoplasmu a jádro). Slouží k odkrájení tkáně až k místu, jehož ultrastruktura má být zobrazena. Následně se nakrájí ultratenké řezy, které je potřeba před prohlížením na transmisním elektronovém mikroskopu nakontrastovat a pouhlíkovat.



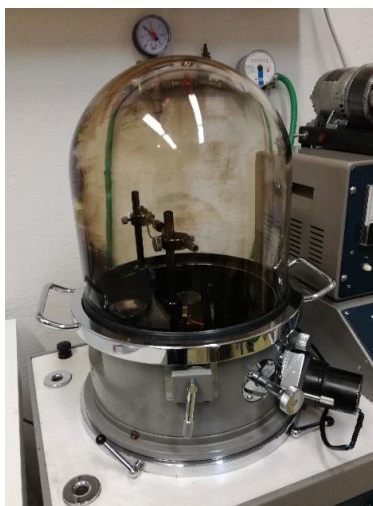
Obr. 8: Ultramikrotom Leica EM UC6 pro krájení pryskyřicových bločků

Kontrastování znamená impregnaci objektů těžkými kovy (U, Pb, Mn), které se adsorbují na buněčné organely. Tím, že tyto kovy více rozptylují primární elektrony, se zvyšuje kontrast vzorků (Nebesářová 2001). Proces je důležitým krokem pro jasnou a zřetelnou identifikaci jednotlivých struktur při prohlížení řezů v elektronovém mikroskopu a vyžaduje pečlivý přístup, aby se předešlo vzniku artefaktů na řezech. Pro kontrastování ultratenkých řezů se nejčastěji používá uranyl acetát a citrát olova.

Uranyl acetát reaguje hlavně s nukleovými kyselinami, ale i s proteiny. Roztok se nanáší injekční stříkačkou s filtrem, aby neobsahoval precipitáty. Kontrastování musí probíhat ve tmě, jelikož na světle vzniká v uranyl acetátu hnědá sraženina. Citrát olova (lead citrát) zvyšuje kontrast membrán, proteinů, nukleových kyselin a glykogenu. Reaguje se vzdušným oxidem uhličitým za vzniku nerozpustného uhličitanu olovnatého, proto se

aplikuje v prostředí se sníženým oxidem uhličitým. Při kombinaci uranyl acetátu a citrátu olova získá preparát vyvážený kontrast všech buněčných struktur (Nebesářová 2001).

Pouhličkování řezů se provádí kvůli zvýšení odolnosti před elektronovým svazkem, ale není to nutný krok, řezy se dají prohlížet již po kontrastování. Bez pouhličkování se řezy mohou trhat. K uhlíkování slouží napařovací přístroj (Obr. 9). Jeho součástí jsou uhlíkové elektrody, z nichž jedna je vytvarovaná do špičky a druhá je zarovnaná. Konce elektrod se téměř dotýkají, což při průchodu elektrickým proudem vede ke zvýšení odporu mezi elektrodami a tím ke zvýšení teploty na hodnotu, při které se vypařuje uhlík. Ten se napráší na vložené síťky s řezy a vytvoří na nich vrstvu silnou 3–5 nm. Proces probíhá ve vakuu po vyčerpání vzduchu difúzní vývěvou (Nebesářová 2001).



Obr. 9: Napařovací přístroj JEOL JEE 4C pro uhlíkování ultratenkých řezů

2 Cíle práce

Seznámení se s účinky AKH, vosičkového jedu, prostudování struktury hrudních svalů octomilky, teoretická příprava pro zhotovení polotenkých a ultratenkých řezů a pochopení principu elektronové mikroskopie bylo předpokladem pro dosažení následujících cílů.

- 1) Stanovení vlivu AKH na účinky vosičkového jedu ve svalové tkáni octomilky, *Drosophila melanogaster*, pomocí porovnání ultrastruktury thorakálních svalových vláken u kontrolních jedinců a jedinců ošetřených jedem a směsí jedu a AKH.
- 2) Odborné zvládnutí přípravy polotenkých a ultratenkých řezů pro potřeby transmisní elektronové mikroskopie.
- 3) Osvojení základů práce s transmisním elektronovým mikroskopem.
- 4) Obrazové zpracování a vyhodnocení získané fotodokumentace.

3 Materiál a metody

3.1 Laboratorní zvířata

V experimentech byly použity 3 dny staré dospělé samice octomilek, *Drosophila melanogaster*, typu white (w^{1118}) z chovů Entomologického ústavu Biologického centra Akademie věd ČR v Českých Budějovicích. Mouchy byly chované ve skleněných zkumavkách se standardní dietou při 25 °C v termostatu při pravidelném střídání světla a tmy (12:12 h). Specifikace experimentálního organismu a popis přípravy diety jsou uvedeny v Příloze 1.

3.2 Pitva a ošetření tkáně

Z experimentálních jedinců byl odebrán thorax tak, že mouchy byly uspány oxidem uhličitým a pod binokulární lupou byla pinzetami od hrudi oddělena přední a zadní část těla, křídla a končetiny.

Následovala hodinová inkubace vypitvaných tkání jednak s *D. melanogaster* AKH (*Drome*-AKH) ředěného v poměru 1:12,5 v Grace médiu (Sigma) nebo s vosičkovým jedem v poměru 1:1,5 v Grace médiu a jednak s jejich kombinací. U kontrolní skupiny byla dávka AKH nahrazena 20% metanolem v Ringerově roztoku (kontrolní roztok, KR). Zásobní roztok *Drome*-AKH obsahuje 2,5 pmol *Drome*-AKH (Vidia)/ μ l KR. Extrakt jedu byl připraven rozdrčením žláz ze 100 dospělců *H. hebetor* v 5 ml Ringerově roztoku, který byl sonikován a zfiltrován (0,22 μ M filtr). Pro každou skupinu byly připraveny tři exempláře hrudi, které byly dále zpracovány pro potřeby elektronové mikroskopie. Příprava Ringerova roztoku je rozepsána v Příloze 2.

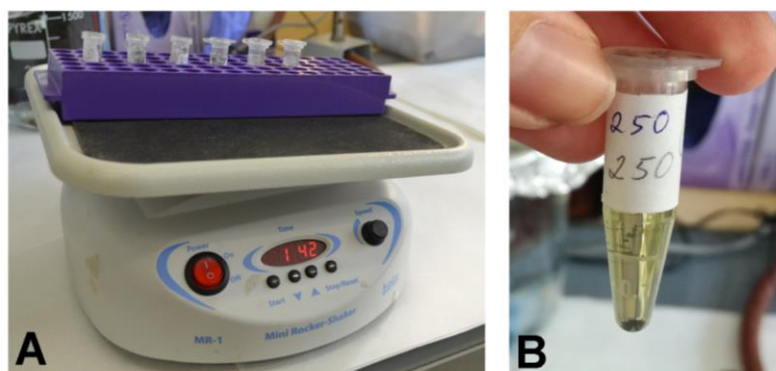
Přehled způsobů ošetření tkáně:

- 1) 23 μ l Grace média + 2 μ l KR
- 2) 23 μ l Grace média + 2 μ l *Drome*-AKH v KR (2,5 pmol AKH/ μ l KR)
- 3) 21 μ l Grace média + 2 μ l jedu (ekvivalent 0,04 jedové žlázy) + 2 μ l KR
- 4) 21 μ l Grace média + 2 μ l jedu + 2 μ l *Drome*-AKH v KR (2,5 pmol AKH/ μ l KR)

3.3 Fixace a zalévání materiálu pro potřeby TEM

Po inkubaci účinnými látkami byly tkáně převedeny do fixačního média, jehož objem byl zhruba 10x větší než objem fixované tkáně. Fixačním médiem byl 2,5% glutaraldehyd v 0,2M pufovaném fosfátovém roztoku (PBS), v němž byly ponechány týden při teplotě 4 °C. Příprava média je uvedena v Příloze 2.

Následovalo odvodňování tkáně vzestupnou acetonovou řadou. Od tohoto kroku se pracovalo v laboratoři elektronové mikroskopie, kde se jednotlivým skupinám přiřadila čísla podle protokolu laboratoře, aby nedošlo k záměně. Nejdříve se ze vzorků muselo vymýt fixační médium. K tomu sloužil vypírací roztok složený z 0,1M pufru a 4% glukózy. Vzorky ve zkumavkách byly promývány 3x 15 min za stálého kývání na třepačce (MR-1 Biosan, Obr. 10A). Poté se vzorky na 2 h ponořily do roztoku vypíracího pufru a 4% OsO₄ v poměru 1:1. Dále byly vzorky odvodněny postupně vzrůstající acetonovou řadou (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% a 100% aceton, každý po 15 min).



Obr. 10: Záběry z přípravy vzorků. (A) Třepačka MR-1 Biosan se vzorky, **(B)** detail zkumavky se vzorkem ve směsi pryskyřice a acetonu.

Dalším krokem bylo prosycování vzorků směsí pryskyřice (EPON medium – složení v Příloze 2) a 100% acetonu v poměru 1:2, 1:1 a 2:1 vždy na 1 h (Obr. 10B). Poté se vzorky již v čisté pryskyřici EPON umístily do exsikátoru na 24 h. Druhý den se vzorky orientovaly v zalévacích silikonových formách (Obr. 11), opatřených papírovými čísly, pod kterými byly vzorky vedeny. Tkáně byly pod binokulární lupou orientovány pro krájení. Takto zpracované vzorky se uložily na 24 h do termostatu vyhřátého na 60 °C, kde proběhla polymerizace pryskyřice. Tkáň zalitá v pryskyřici byla krájena ultramikrotomem na poloténké a ultratenké řezy.

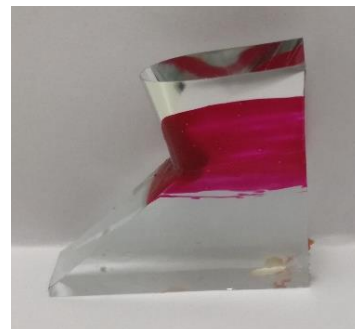


Obr. 11: Silikonová forma se zalitými vzorky

3.4 Zhotovení polotenkých řezů

3.4.1 Příprava skleněného nože

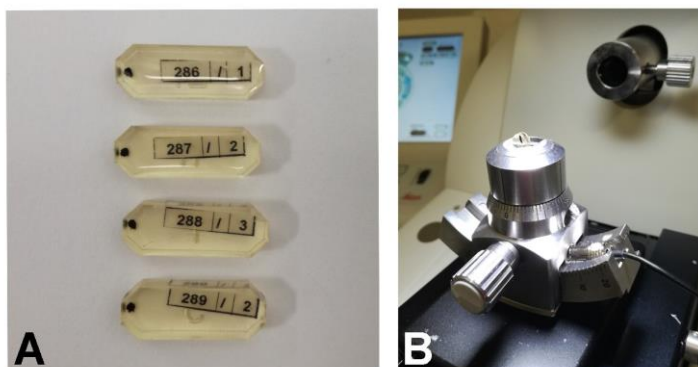
Pryskyřicové bločky se zalitou tkání vyžadovaly další pečlivou úpravu, než se mohlo přistoupit k samotnému krájení na polotenské řezy. Nezbytným krokem před krájením byla příprava skleněného nože. Ten byl připraven lámáním speciální skleněné tyče na přístroji zvaném „knife maker“. Ostří nože bylo kontrolováno pod binokulární lupou, protože na jeho dokonalém lomu závisela kvalita řezů. Nedokonale zhotovený nůž by mohl způsobit poškrábání nebo dokonce roztržení řezů. Výsledný trojúhelníkový nůž s úhlem klínu 45° (Obr. 12), se oblepil speciální páskou, která se upevnila lakem (nebo voskem) tak, aby se vytvořila vanička pro destilovanou vodu. Na její hladinu se později splavovaly nakrájené řezy.



Obr. 12: Skleněný nůž s vaničkou

3.4.2 Trimování

Zalité vzorky v bločku pryskyřice (Obr. 13A) bylo potřeba upravit trimováním, tj. ruční seřezání pryskyřice okolo tkáně do tzv. pyramidy za účelem zmenšení plochy řezu. Z každé ze 4 skupin se vybral jeden nejlépe naorientovaný bloček ze tří zpracovaných exemplářů. Trimování probíhalo pod mikroskopem ultramikrotomu Leica EM UC6, kde byl každý bloček zvlášť upevněn v držáku (zaaretován) (Obr. 13B) a přebytečná pryskyřice byla odstraněna žiletkou. Cílem bylo vytvořit na bločku při pohledu shora pravidelný lichoběžník s delší základnou směřující při krájení k noži, aby se zamezilo nestabilitě při krájení. Muselo se ovšem přihlížet na velikost a proporce zalité tkáně a přizpůsobit tomu ořez.



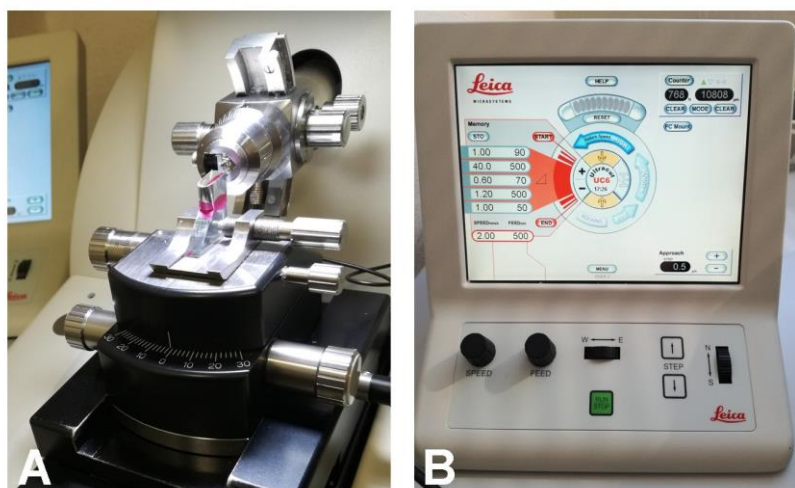
Obr. 13: Úprava bločků. (A) Pryskyřicové bločky se vzorky s příslušným označením, (B) bloček připravený k trimování je upevněn v držáku na pozici obvyklé pro stolek s nožem na ultramikrotomu Leica EM UC6.

3.4.3 Krájení materiálu a barvení polotenkých řezů

Důležitým krokem určujícím kvalitu řezů bylo správné seřízení celého mikrotomu, zejména orientace bločku se vzorkem vzhledem k noži. Nůž fixovaný ve stolku mikrotomu byl opatrně mechanicky přiblížen k upevněnému bločku na vahadle mikrotomu. Do vaničky byla nalita voda až po okraj tak, aby hrana nože nebyla suchá a zároveň aby voda nepřetékala za řeznou hranu nože. Tato optimální hladina byla pro krájení důležitá, jinak by řezy byly stahovány za hranu nože, nebo by byly shrnovány. Okometricky se hladina jevila jako stříbrná. Stolek s nožem byl pozvolna přibližován k vahadlu s bločkem, dokud se neukázal stín na jeho přední straně. Bylo potřeba dostat rovný stín dopravením pozice nože a bločku. Jelikož přední strana bločku nebyla dokonale rovná, první zhotovené řezy byly neúplné a bloček se musel odkrájet, dokud se netvořily kompletní řezy z celé plochy bločku.

Vzorky byly nakrájeny na ultramikrotomu Leica EM UC6 rychlostí 2 mm/s na polotenské řezy o tloušťce 500 nm (Obr. 14). Nakrájené řezy, které na vodní hladině vypadaly duhově, byly nabrány jehlou a přeneseny do připravené kapky 10% acetonu na podložním skle v průměrném počtu 15 kusů. Sklíčko s řezy bylo umístěno na plotýnku (Slides Warmer XH-2002) nastavenou na 45 °C, aby se řezy natáhly a uschly.

Na zaschlé řezy se nanasle přefiltrovaný roztok 1% toluidinové modře (Sigma) v 1% tetraboritanu sodném (Sigma). Podložní sklo s naneseným barvicím roztokem se ponechalo 1 min na plotýnce vyhřáté na 45 °C. Preparát byl opláchnut destilovanou vodou a umístěn zpět na plotýnku k vysušení.



Obr. 14: Ultramikrotom v procesu krájení. (A) Záběr na stolek s nožem a vahadlo s bločkem, (B) displej ultramikrotomu, kde lze nastavit rychlost krájení (mm/s) a tloušťku řezů (nm). Tlačítka pod displejem se ovládá ultramikrotom.

3.4.4 Zhotovení trvalých preparátů a dokumentace polotenkých řezů

Trvalé preparáty byly zhotoveny nanesením kapky pryskyřice na řezy a přiložením krycího sklíčka (Obr. 15). Zhotovený preparát byl umístěn na plotýnku vyhřátou na 45 °C, kde došlo k natažení pryskyřice až ke krajům krycího sklíčka. Preparáty byly ponechány při pokojové teplotě do druhého dne, než pryskyřice zatvrdla.



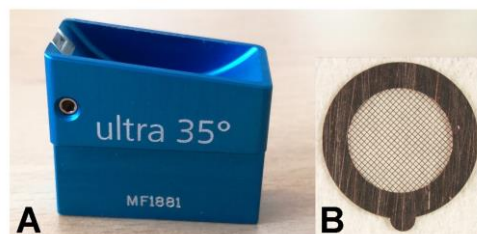
Obr. 15: Trvalý preparát s polotenkými řezy

Hotové polotenské řezy byly zdokumentovány pomocí světelného mikroskopu Olympus BX51 a kamery Olympus DP80 za použití diferencially interferenčního kontrastu a objektivu o zvětšení 20x a 100x. Pořízené snímky byly upraveny v programu Adobe Photoshop (Adobe Systems). Snímky byly umístěny na plato 18 x 24 cm s rozlišením 300 pixelů na palec. Byl upraven kontrast, jas a v případě potřeby ostrost. Snímky byly opatřeny odpovídajícím měřítkem a popisky.

3.5 Zhotovení ultratenkých řezů

Ultratenké řezy o tloušťce 70 nm byly zhotoveny s použitím komerčně vyráběného diamantového nože (Diatome MF1881, Obr. 16A) na stejném ultramikrotomu jako polotenské řezy. Postup při přípravě bločku, trimování a vlastní krájení byl obdobný jako u polotenkých řezů s tím rozdílem, že byla zmenšena plocha objektu (byla co nejvíce odstraněna přebytečná pryskyřice). Na vodní hladině měly ultratenké řezy zlatou barvu. Rozdíl oproti polotenkým řezům je dán interferenčními barvami, které se odlišují podle tloušťky řezů.

Po nakrájení byly ultratenké řezy ve vaničce nataženy parami chloroformu tak, aby byly vyrovnány nerovnosti vzniklé při krájení. Z vodní hladiny byly řezy nabírány na měděné síťky o průměru 3,05 mm (Electron Microscopy Sciences, 300 mesh, Obr. 16B) propláchnuté ve 100% acetonu tak, že se řezy podebraly a opatrně



Obr. 16: Nástroje pro zhotovení ultratenkých řezů. (A) Diamantový nůž (Diatome), (B) měděná síťka (Electron Microscopy Sciences) sloužící jako nosič ultratenkých řezů.

vyzvedly nad hladinu. Manipulace s takto tenkými řezy musela být opatrnější a jemnější než u polotekných řezů. K jejich orientaci na síťce byla použita lidská řasa nebo chlup z dalmatina připevněný do špejle. Na jednu síťku se nabralo od 1 do 5 řezů, záleželo na velikosti objektu. Síťky s řezy byly sušeny v Petriho misce na filtračním papíře.

Pokud byly použity zcela nové síťky, bylo potřeba je dokonale očistit postupným promytím v několika roztocích: 50% kyselina octová, jarová voda, destilovaná voda, aceton, vždy po 5 min. Následně byly čištěny ultrazvukem a sušeny na filtračním papíře. Před použitím byly propláchnuty ve 100% acetonu.

3.6 Kontrastování ultratenkých řezů

Kapky uranyl acetátu (0,3M v 50% metanolu), jejichž počet odpovídal počtu sítěk, byly nanесeny stříkačkou s filtrem na parafilm v krabičce (Nivea), kde byla vytvořena etanolová atmosféra pomocí čtverečku buničiny navlhčené v etanolu (Obr. 17A). Síťky se položily na kapky řezy dolů, kde byly ponechány ve tmě 30 minut (Obr. 17B). Poté byly síťky uchopeny do pinzety a razantním pohybem ruky propláchnuty ve 30% etanolu ve třech Petriho miskách, aby se předešlo tvorbě artefaktů na vzorcích. Následně byly síťky sušeny na filtračním papíře.

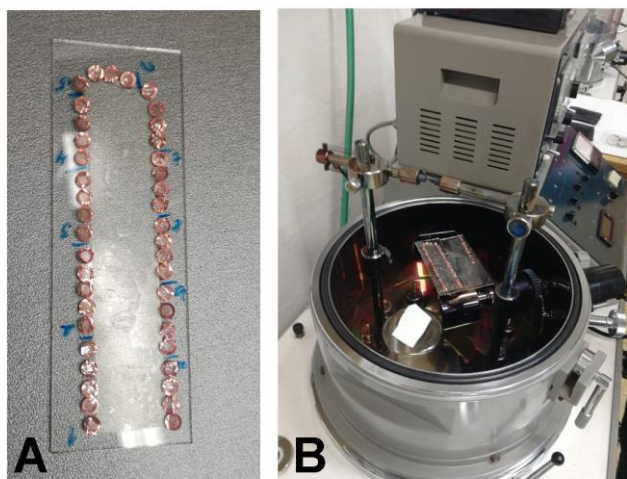
Mikropipetou o objemu 20 μ l byly nanесeny malé kapky 1mM lead citrátu podle počtu sítěk na parafilm v Petriho misce (Obr. 17C). Byla vytvořena atmosféra se sníženým obsahem oxidu uhličitého přidáním několika peciček hydroxidu sodného zalitých vodou. Síťky byly položeny na kapky řezy dolů a přikrytím neprůhlednou krabičkou byly drženy ve tmě po dobu 20 min. Po této době byly síťky opět razantněji propláchnuty v redestilované vodě ve třech Petriho miskách. Nakonec byly síťky usušeny na filtračním papíře. Příprava roztoků pro kontrastování je uvedena v Příloze 2.



Obr. 17: Záběry z kontrastování ultratenkých řezů. (A) Kapky uranyl acetátu se síťkami na parafilmu v etanolové atmosféře, **(B)** probíhající kontrastování v krabičkách, **(C)** kapky citrátu olova se síťkami na parafilmu v atmosféře se sníženým obsahem CO_2 .

3.7 Pouhlikování ultratenkých řezů

Čisté podložní sklo (Obr. 18A) bylo opatřeno oboustrannou transparentní páskou, po jejím obvodu byly nalepeny síťky za část svého okraje, aby mohly být po skončení procesu snadno odlepeny. Na podložní sklo byla k síťkám napsána lihovým fixem čísla vzorků, aby nedošlo k záměně. Takto připravené sklo bylo vloženo do napařovací aparatury JEOL JEE 4C (Obr. 18B) spolu s keramickým střepem, na který byla nanесena kapka oleje. Zároveň byly pomocí ořezávacího přístroje upraveny uhlíkové elektrody, jedna vytvarováním do špičky a druhá zarovnaním. Po zavření aparatury byla na 30 min spuštěna difúzní vývěva pro vyčerpání vzduchu. Poté již proběhlo napaření 3–5 nm vrstvy uhlíku na síťky. Kvalita pouhlikování byla překontrolována díky kontrastu mezi naprášeným uhlíkem na povrchu střepu a oblastí s kapkou bez uhlíku, která zůstala světlá. Pouhlikované síťky byly vráceny do Petriho misek, dle jejich číslování.



Obr. 18: Záběry z pouhlikování ultratenkých řezů. (A) Podložní sklo s přilepenými síťkami, (B) napařovací aparatura JEOL JEE 4C bez poklopu (recipientu) se vzorky a keramickým střepem obsahujícím kapku oleje.

3.8 Prohlížení a dokumentace ultratenkých řezů

Naktrastované a pouhlikované ultratenké řezy o velikosti 70 nm byly prohlíženy a dokumentovány pomocí transmisního elektronového mikroskopu JEOL JEM-1010 (Obr. 7). Tento elektronový mikroskop umožňuje zvětšení až 500 000x, rozlišovací schopnost činí 0,45 nm a jeho urychlovací napětí má rozsah 40–100 kV.

Do držáku se umístily maximálně dvě síťky, které byly postupně prohlíženy se zvětšením 12 000–15 000x. Byla pořizována fotodokumentace sítěk obsahujících řezy thorakálních svalů ošetřených čtyřmi výše zmíněnými způsoby. Zhotovené snímky byly upraveny v programu Adobe Photoshop (Adobe Systems) obdobně jako obrázky polotenkých řezů.

3.9 Měření délky sarkomer

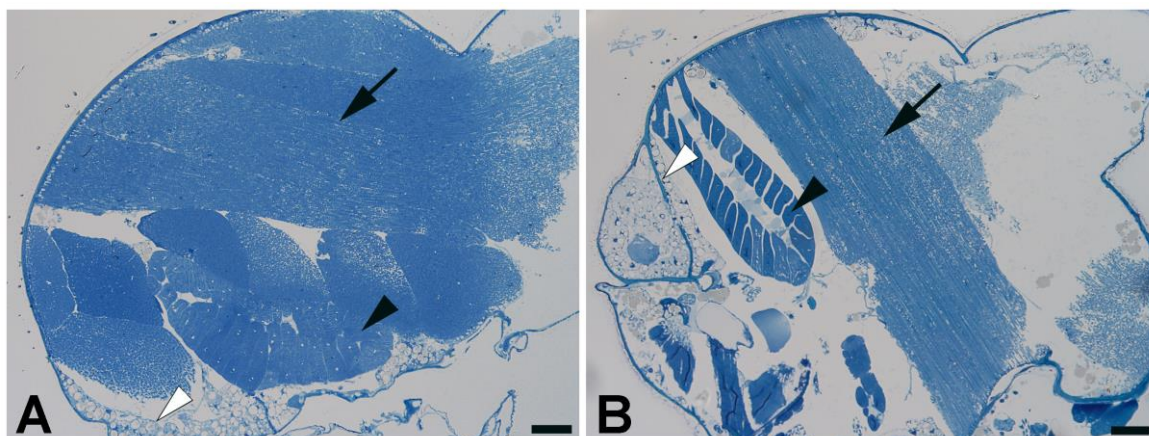
Délka svalových sarkomer byla analyzována v programu Imaris verze 6.3.1 (Bitplane). Z každé pokusné skupiny byla stanovena délka 15 sarkomer. Naměřené hodnoty byly převedeny do programu Excel, kde byly stanoveny průměrné hodnoty, které byly vyneseny do sloupcového grafu ukazující směrodatné odchylky. Data byla statisticky analyzována v programu Prism verze 6.0 (Graph Pad Software). Statisticky významné rozdíly byly vyhodnoceny použitím testu jednocestná ANOVA s Tukeyho post-hoc testem.

Poznámka: Fotografie materiálového a přístrojového vybavení použité v části Úvod a Materiál a metody jsou vlastní fotografie pořízené digitálním fotoaparátem Nikon D5100 nebo mobilním telefonem Huawei P9 Lite.

4 Výsledky

4.1 Analýza polotenkých řezů thoraxu octomilky

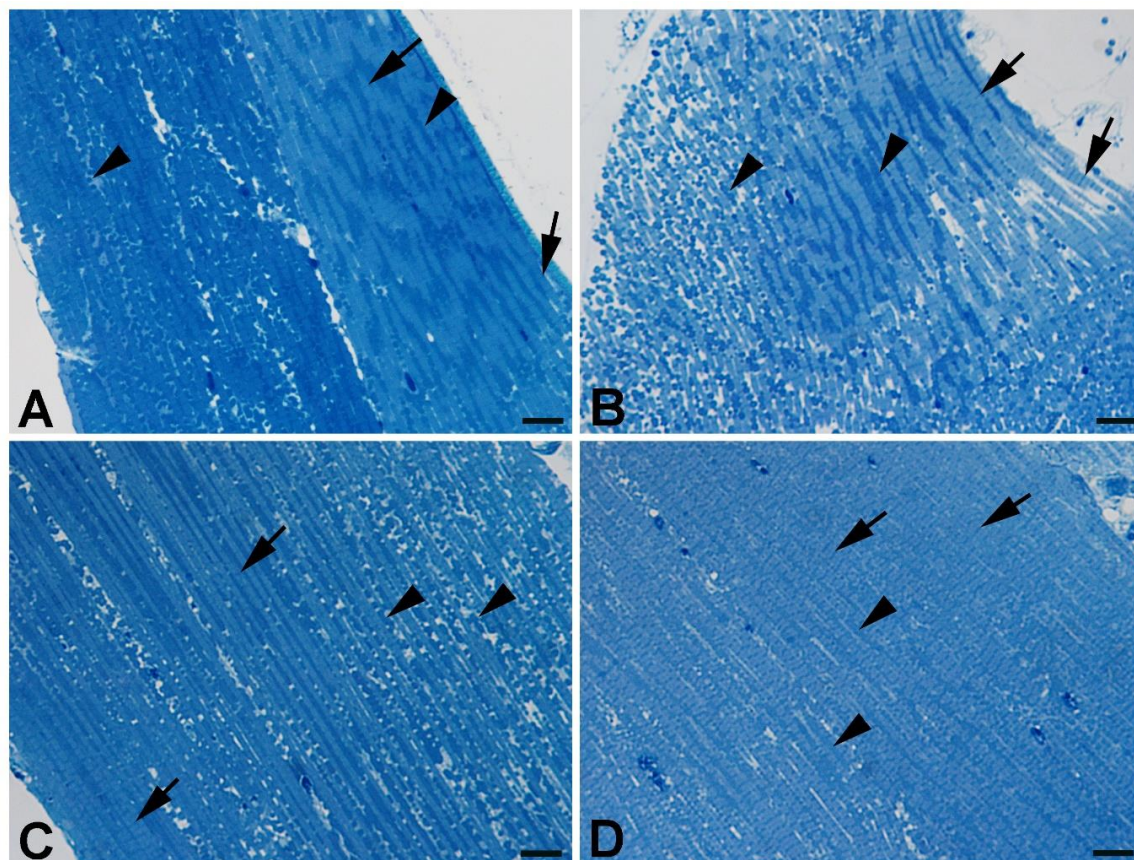
Snímky polotenkých řezů celým thoraxem (Obr. 19) byly zhotoveny ve světelném mikroskopu s použitím objektivu se zvětšením 20x. Na řezech jsou dobře rozlišitelné jednotlivé skupiny příčně pruhované svaloviny. Je viditelný také celý průběh dorzoventrálních svalů, které prochází skrz thorax ve vertikálním směru a upínají se na sternum a tergum exoskeletu. Dále jsou zde patrné příčné řezy dorzolongitudinálními svaly. Kromě svalů lze dobře pozorovat i tukové těleso. Při tomto rozlišení nebyly po aplikaci jedu pozorovány žádné viditelné změny ve struktuře svalu. Polotenské řezy tak pouze umožnily udělat si celkovou představu o základním uspořádání svalové tkáně v thoraxu.



Obr. 19: Ukázka průřezu thoraxem *D. melanogaster* w¹¹¹⁸. (A) Thorax ošetřený vosičkovým jedem a AKH, (B) thorax ošetřený vosičkovým jedem. Polotenské řezy o tloušťce 500 nm barvené toluidinovou modří ukazují podélně říznuté dorzoventrální svaly (černé šipky), příčně říznuté dorzolongitudinální svaly (černé hlavy šipek) a tukové těleso (bílé hlavy šipek). Měřítko: 50 μ m.

Pomocí objektivu se zvětšením 100x byly pořízeny detailní záběry podélných řezů dorzoventrálních svalů. Při tomto zvětšení (Obr. 20) lze již sledovat detailnější strukturu svalových vláken, kde lze rozlišit jednotlivé myofibrily a zejména jejich Z-linie, místa ukotvení aktinových filament. Ty jsou na snímcích viditelné jako syté, tmavě modré proužky (v Obr. 20 označeno šipkami). Dokonce je možné rozlišit i mitochondrie v okolí myofibril (v Obr. 20 označeno hlavami šipek). Při detailním prozkoumání snímku jsou pozorovány rozdíly mezi svalovými vlákny jedinců ošetřených vosičkovým jedem a ostatními skupinami. Zatímco u jedinců ošetřených AKH a AKH spolu s vosičkovým jedem nebyl

zaznamenán žádný výrazný rozdíl vůči kontrole (Obr. 20A, B, D), v myofibrilách jedinců ošetřených pouze samotným vosičkovým jedem (Obr. 20C) byly Z-linie málo zřetelné.

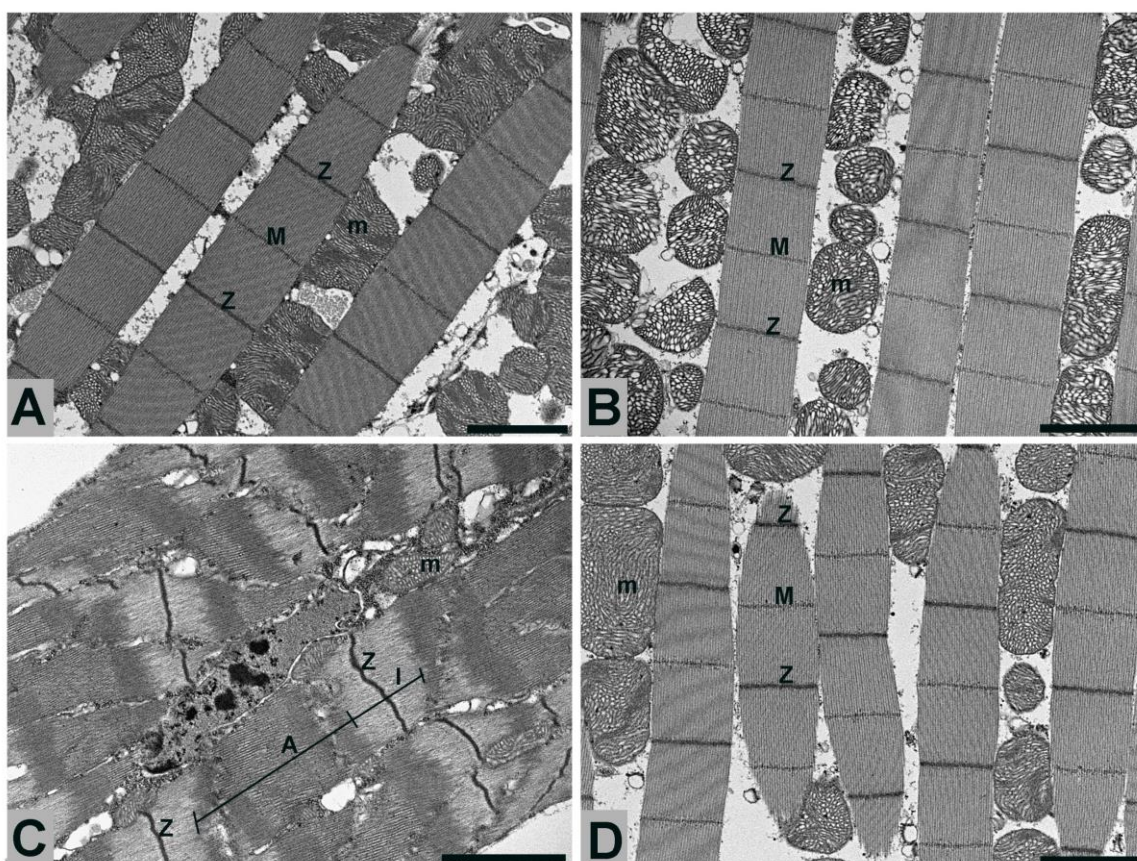


Obr. 20: Poloténkové řezy příčně pruhovanou thorakální svalovinou *D. melanogaster* w¹¹¹⁸. (A–D) Detailní záběry na část podélného řezu dorzoventrálním svalem o tloušťce 500 nm barvené toluidinovou modří z kontrolních jedinců (A), z jedinců ošetřených AKH (B), z jedinců ošetřených vosičkovým jedem (C) a z jedinců ošetřených vosičkovým jedem a AKH (D). Šipky ukazují na viditelné Z-linie v příčně pruhované svalovině, hlavy šipek značí mitochondrie. Měřítka: 10 μ m.

4.2 Analýza ultratenkých řezů thoraxu octomilky

Snímky z transmisního elektronového mikroskopu ukazují ultrastrukturu thorakálních svalů při zvětšení 12 000–15 000x (Obr. 21). U myofibril v kontrolní skupině jsou zřetelně rozlišitelné Z-linie oddělující sarkomery a M-linie ležící ve středu myozinových vláken (Obr. 21A). Ošetření vosičkovým jedem vyvolalo zřetelné změny v ultrastruktuře těchto svalů a viditelně změnilo strukturu myofibril (Obr. 21C). Lze zde sledovat relaxaci myofibril

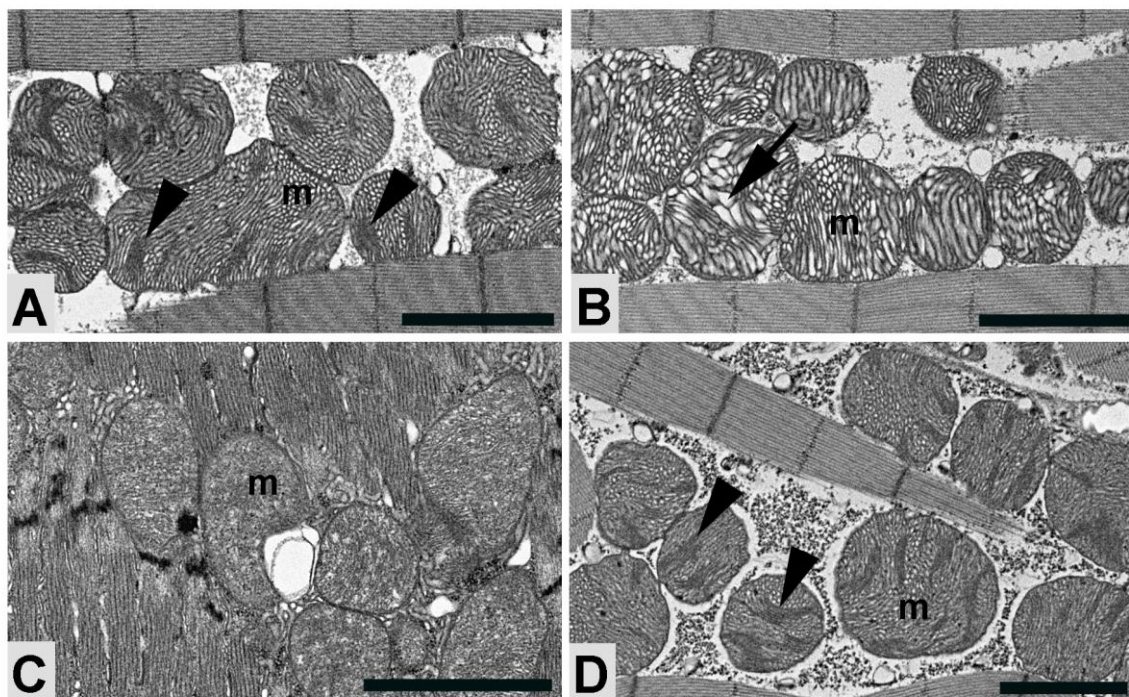
spojenou s výrazným prodloužením sarkomer a zviditelněním světlých I-pruhů tvořených výhradně aktinovými vlákny. Z-linie tvořené ukotvením aktinových vláken jsou výrazné, ale neleží v jedné rovině, navíc M-linie nejsou detekovatelné vůbec. Naopak struktura myofibril ze svalů ošetřených vosičkovým jedem spolu s AKH (Obr. 21D) se podobá situaci u kontrol: přítomnost hormonu evidentně zabránila vzniku ultrastrukturních změn. Kontrolní aplikace samotného AKH (Obr. 21B) žádné výrazné změny struktury myofibril nevyvolala a jejich celkový vzhled se podobal kontrole.



Obr. 21: Ultratenké řezy thorakálních svalů *D. melanogaster* w¹¹¹⁸. (A–D) Detailní snímky ukazující ultrastrukturu myofibril a mitochondrií ležící v jejich okolí z kontrolních jedinců (A), z jedinců ošetřených AKH (B), z jedinců ošetřených vosičkovým jedem (C) a z jedinců ošetřených vosičkovým jedem a AKH (D). Tloušťka řezů 70 nm. Z, Z-linie; M, M-linie; m, mitochondrie; A, myozinový A-pruh; I, aktinový I-pruh. Měřítka: 2 μ m.

Během studia svalových ultrastruktur byly zaznamenány také výrazné změny ve struktuře mitochondrií. U kontrolní skupiny (Obr. 22A) mají mitochondrie pravidelné krysty, které jsou místy více nahloučeny, což se projevuje jako tmavší místa na pořízených snímcích. Naproti tomu jak u jedinců ošetřených jedem (Obr. 22C), tak u jedinců ošetřených

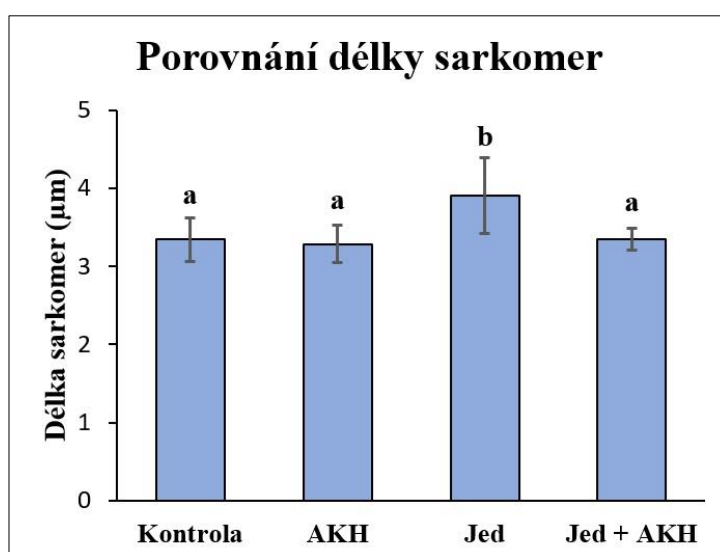
AKH (Obr. 22B) lze jasně pozorovat změny mitochondriální ultrastruktury. Zatímco u jedinců ošetřených jedem jsou krysty mitochondrií v porovnání s kontrolou velice nahuštěny, u jedinců ošetřených AKH naopak dochází k jejich výraznému rozvolnění a vakuolizaci. Ani jeden tento pozměněný typ mitochondrií nebyl zaznamenán u jedinců ošetřených AKH spolu s vosičkovým jedem (Obr. 22D), které se strukturně podobají mitochondriím v kontrolní skupině (Obr. 22A).



Obr. 22: Ultrastruktura mitochondrií v podélném řezu svalovým vláknem *D. melanogaster* w¹¹¹⁸. (A–D) Detailní snímky skupiny mitochondrií (m) ležících mezi dvěma myofibrilami u kontrolních jedinců (A), u jedinců ošetřených AKH (B), u jedinců ošetřených vosičkovým jedem (C) a u jedinců ošetřených vosičkovým jedem a AKH (D). Šipka ukazuje na výraznou vakuolizaci, hlavy šipek značí místa s občasým nahloučením krist. Měřítko: 2 μ m.

4.3 Srovnání délky sarkomer u testovaných skupin

Na snímcích thorakálních svalů *D. melanogaster* pořízených transmisním elektronovým mikroskopem byla u každé testované skupiny proměřena délka 15 sarkomer, tj. vzdálenost mezi dvěma sousedními Z-liniemi. Jejich průměrné hodnoty z každé skupiny byly vzájemně porovnány (Obr. 23). Průměrné délky sarkomer u kontrolních vzorků (3,34 μm), vzorků ošetřených AKH (3,28 μm) a jedem s AKH (3,35 μm) dosahují obdobných hodnot, zatímco sarkomery u vzorků ošetřených pouze jedem jsou signifikantně delší (3,90 μm). Vosičkový jed způsobuje prodloužení sarkomer o 16,77 % vzhledem k průměrné délce sarkomer kontrolních vzorků.



Obr. 23: Délka sarkomer po různém ošetření thorakálních svalů *D. melanogaster*. Statisticky významné rozdíly mezi hodnotami na 0,1% hladině průkaznosti testované jednocestnou ANOVA a Tukeyho post-hoc testem jsou znázorněny odlišnými písmeny nad jednotlivými sloupci (průměr \pm SD, $n = 15$).

5 Diskuze

Již dříve bylo prokázáno, že AKH dokáže zpozdit nebo zmírnit nervosvalovou paralýzu vyvolanou jedem z vosičky *H. hebetor* u *P. apterus* (Shaik et al. 2017). Avšak mechanismus, kterým AKH ovlivňuje průběh neuroparalýzy nebyl zcela objasněn. Studium svalové ultrastruktury u *D. melanogaster* umožňuje detailně sledovat změny vyvolané aplikací, jak vosičkového jedu, tak AKH a poodhalit tak mechanismy jejich působení.

Po hodinové inkubaci thoraxu dospělé octomilky v médiu v přítomnosti vosičkového jedu byly v ultrastruktuře myofibril pozorovány výrazné změny ve srovnání s kontrolními jedinci. U kontrolní skupiny se uspořádání aktinových a myozinových vláken jeví jako ne zcela relaxované, což zřejmě odpovídá stavu mírného svalového tonu, který je charakterizován částečným zasunutím myozinových vláken mezi vlákna aktinová a ztrátou světlého I-pruhu aktinových vláken v okolí Z-linie. Naproti tomu na ultrastruktuře myofibril po ošetření vosičkovým jedem je I-pruh zřetelně viditelný, a navíc u těchto vláken dochází k prodloužení délky sarkomer o 16,77 %. Přítomnost I-pruhu i prodloužení sarkomery jsou typické pro relaxovaný sval. Je zajímavé, že při aplikaci vosičkového jedu spolu s AKH tyto výrazné změny nebyly pozorovány a ultrastruktura svalu odpovídá kontrolní situaci. Podobně je tomu také při aplikaci samotného AKH.

Kromě uspořádání myofibril došlo po aplikaci vosičkového jedu k výrazným změnám v ultrastruktuře mitochondrií. V porovnání s kontrolou zde bylo pozorováno značné nahuštění mitochondriálních krist. Po ošetření vosičkovým jedem společně s AKH se struktura mitochondrií příliš neliší od mitochondrií v kontrolní skupině, čili došlo k podobné situaci jako v případě myofibril. Je zajímavé, že po ošetření svalů samotným AKH byla v mitochondriích pozorována výrazná vakuolizace a oddálení krist od sebe, tj. opačná tendence než bylo pozorováno po aplikaci jedu.

Ze studií o působení vosičkového jedu vyplývá, že jed pravděpodobně vyvolává paralýzu příčně pruhované svaloviny přes blokaci exocytózy glutamátu z presynaptických váčků v nervosvalové ploténce (Slavnova 1987, Pennacchio a Strand 2006). Pokud není glutamát uvolňován do synaptické štěrbiny, neaktivuje své postsynaptické glutamátové receptory na povrchu svalu, a tak nedochází ke svalové stimulaci. Jedním z typů glutamátových receptorů jsou receptory spřažené s G-proteiny, které aktivují metabolickou dráhu vedoucí k uvolnění vápníku z endoplazmatického retikula podobně jako je tomu u receptorů AKH (Gäde a Auerswald 2003).

Na základě dostupných poznatků o mechanismu působení vosičkového jedu a AKH a získaných výsledků byla vytvořena následující hypotéza. Předpokládá se, že po podání vosičkového jedu nemůže glutamát aktivovat své receptory na postsynaptické svalové membráně, a tak s největší pravděpodobností nedojde ke zvýšení koncentrace Ca^{2+} iontů v sarkoplasmě. Nízká koncentrace Ca^{2+} iontů zabrání svalovému stahu a udržuje sval v relaxovaném stavu, jak bylo možné pozorovat po podání vosičkového jedu. Jelikož AKH rovněž působí přes receptory spřažené s G-proteiny, mohla by aktivace AKH receptorů směřující rovněž ke zvýšení koncentrace Ca^{2+} iontů v sarkoplasmě převzít funkci glutamátu. Dalším možným vysvětlením by bylo zapojení AKH již v presynaptické dráze, kde by aktivací svých receptorů na presynaptické membráně vyvolal odstranění blokace exocytózy glutamátu. O možnosti zapojení AKH receptorů do formování presynaptických váčků svědčí pokusy na buněčné linii HEK-293. Tato linie exprimovala fluorescenčně značený AKH receptor *Bombyx mori*, který byl po aktivaci AKH ligandem začleněn do váčků potažených klathrinem a po odstranění ligandu byl opět začleněn do povrchové membrány (Huang 2011).

S hladinou vápníku v sarkoplasmě mohou také souviset změny pozorované v mitochondriích. Kromě toho, že jsou mitochondrie hlavním zdrojem energie v podobě ATP, mohou pravděpodobně sloužit také jako zásobárna vápníku (Miller 1998). Lze tedy spekulovat, že v případě nadbytku vápníku v sarkoplasmě, který je vyvolán ošetřením svalů AKH, může dojít k jeho zpětnému ukládání do mitochondrií, což se projeví zvýšenou vakuolizací. V případě nedostatku vápníku, vyvolaném ošetřením svalů vosičkovým jedem, je naopak zásoba vápníku z mitochondrií spotřebována. Dalším vysvětlením je rozdílná potřeba ATP v kontrahovaných a relaxovaných svalech, kdy v průběhu relaxace nastávají největší nároky na produkci ATP. Vakuolizace a podobná disorganizace krist byla pozorována při potlačení exprese genu *optic atrophy 1 (opa1)* v letových svalech dospělce *D. melanogaster*. Protein OPA1 je klíčovým faktorem zodpovědným za fúzi vnitřních membrán a těsnost spojení jednotlivých krist (Macchi 2013, Frezza et al. 2006, Meeusen et al. 2006). Další podobné změny v mitochondriích v srdečním svalu myši byly vyvolány působením diallyl trisulfidu, lipofilní organosulfurové složky česneku, působící jako antioxidant, na účinky arzenu. Zatímco působení samotného arzenu vedlo k rozpadnutí mitochondrií, přítomnost diallyl trisulfidu způsobilo pouze zvýšenou vakuolizaci (Sumedha 2015).

Přestože AKH může při současné aplikaci s jedem jeho účinky zmírnit, nedokáže však paralýzu zvrátit, pokud je podán až dodatečně. Toto zjištění by ukazovalo spíše na to,

že změny způsobené výrazným ochabnutím svalstva jsou nevratné. O tom svědčí i fakt, že ve svalech ošetřených jedem nelze identifikovat charakteristickou M-linii uprostřed meromyozinového H-pruhu na snímcích z TEM.

K ověření účinků AKH na působení vosičkového jedu v thorakálních svalech *D. melanogaster* by bylo možné použít linii octomilek s mutací genu v AKH receptoru (AKH-R). U této linie by se účinek AKH neměl projevit a kombinace jedu s AKH by měla vyvolat stejné účinky jako působení jedu samotného. Použití mutanta AKH-R by též vyloučilo případnou možnost deaktivace jedu navázáním AKH na jeho vazebná místa ještě před aplikací na tkáň. Přestože tato práce poskytuje částečný vhled do působení vosičkového jedu na tkáň thorakálních svalů, jeho kompletní porozumění vyžaduje ještě další studie.

6 Závěr

Tato práce provádí přehled o působení vosičkového jedu v součinnosti s AKH na thorakální svaly u *D. melanogaster*. Podání jedu vyvolalo výrazné změny v ultrastruktuře myofibril i mitochondrií, které byly potlačeny v případě podání jedu společně s AKH. AKH samotný neovlivňoval uspořádání svalového vlákna, ale v mitochondriích působil vakuolizaci.

Při studiu této problematiky jsem se zdokonalila v přípravě polotenkých a ultratenkých řezů pro TEM, seznámila jsem se se základy práce s transmisním elektronovým mikroskopem a naučila se zpracovat pořízenou dokumentaci v programech Adobe Photoshop (Adobe Systems) a Imaris (Bitplane). Získané zkušenosti využiji při samostatném provedení ověřovacích experimentů, do kterých zahrnu i mutantní linii *D. melanogaster* AKH-R.

7 Seznam použitých zkratek

A	A-pruh
AC	adenylát cykláza
AKH	adipokinetický hormon
AKH-R	receptor pro adipokinetický hormon
AKH/RPCH	adipokinetické hormony/červený pigment koncentrující hormony
CA	<i>corpora allata</i>
CC	<i>corpora cardiaca</i>
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CoA	koenzym A
CCD kamera	charge-coupled device kamera
DAG	diacylglycerol
<i>Drome-AKH</i>	adipokinetický hormon u <i>Drosophila melanogaster</i>
dIm	dorzolongitudinální svaly
dVm	dorzoventrální svaly
ER	endoplazmatické retikulum
FFA	volné mastné kyseliny
G-1-P	glukóza-1-fosfát
G-6-P	glukóza-6-fosfát
GPh	glykogen fosforyláza
H	H-oblast
I	I-pruh
IP ₃	inositol trifosfát
KR	kontrolní roztok
M	M-linie
m	mitochondrie
OPA1	Optic Atrophy 1
pcm	pleurocoxální svaly
PIP ₂	fosfatidylinositol bisfosfát
PKA	protein kináza A
PBS	pufrovaný fosfátový roztok
PKC	protein kináza C

PLC	fosfolipáza C
<i>Pyrap</i> -AKH	adipokinetický hormon u <i>Pyrrhocoris apterus</i>
R	receptor
scm	sternocoxální svaly
SD	směrodatná odchylka
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
spm	sternopleurální svaly
T-6-P	trehalóza-6-fosfát
TAG	triacylglycerol
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
tpm	tergopleurální svaly
vln	ventrolongitudinální svaly
Z	Z-linie

8 Seznam použité literatury

BAKER, Phillip W., Kathleen K. Kelly TANAKA, Niels KLITGORD a Richard M. CRIPPS. Adult myogenesis in *Drosophila melanogaster* can proceed independently of myocyte enhancer factor-2. *Genetics*. 2005, **170**(4), 1747-1759. DOI: 10.1534/genetics.105.041749. ISSN 0016-6731.

BEARD, Raimon L. The toxicology of *Habrobracon* venom: A study of a natural insecticide. *Bulletin*. The Connecticut Agricultural Experiment Station, 1952, **562**, 1-27.

COOPER, Geoffrey M. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd ed. Sunderland (MA): Sinauer, 2000. ISBN 9780878931064.

DEORA, Tanvi, Namrata GUNDIAH a Sanjay P. SANE. Mechanics of the thorax in flies. *The Journal of Experimental Biology*. 2017, **220**(8), 1382-1395. DOI: 10.1242/jeb.128363. ISSN 0022-0949.

FABIAN, Benjamin, Katharina SCHNEEBERG a Rolf Georg BEUTEL. Comparative thoracic anatomy of the wild type and wingless (*wg1cn1*) mutant of *Drosophila melanogaster* (Diptera). *Elsevier: Arthropod Structure & Development*. 2016, **45**(6), 1-26.

FREZZA, Christian, Sara CIPOLAT, Olga MARTINS DE BRITO, et al. OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell*. 2006, **126**(1), 177-189. DOI: 10.1016/j.cell.2006.06.025. ISSN 00928674.

GÄDE, Gerd. Peptides of the adipokinetic hormone/red pigment-concentrating hormone family. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2009, **1163**(1), 125-136. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2008.03625.x. ISSN 00778923.

GÄDE, Gerd a Lutz AUERSWALD. Mode of action of neuropeptides from the adipokinetic hormone family. *General and Comparative Endocrinology*. 2003, **132**(1), 10-20. DOI: 10.1016/S0016-6480(03)00159-X. ISSN 00166480.

GÄDE, Gerd a Graham J. GOLDSWORTHY. Insect peptide hormones: a selective review of their physiology and potential application for pest control. *Pest Management Science*. 2003, **59**(10), 1063-1075. DOI: 10.1002/ps.755. ISSN 1526498X.

GÄDE, G., K. H. HOFFMANN a J. H. SPRING. Hormonal regulation in insects: facts, gaps, and future directions. *Physiological Reviews*. 1997, **77**(4), 963-1032. DOI: 10.1152/physrev.1997.77.4.963. ISSN 0031-9333.

HUANG, Haishan, Xiaoyan DENG, Xiaobai HE, et al. Identification of distinct c-terminal domains of the Bombyx adipokinetic hormone receptor that are essential for receptor export, phosphorylation and internalization. *Cellular Signalling*. 2011, **23**(9), 1455-1465. DOI: 10.1016/j.cellsig.2011.04.006. ISSN 08986568.

KARLÍK, Miroslav. *Úvod do transmisní elektronové mikroskopie*. Praha: České vysoké učení technické, 2011. ISBN 978-80-01-04729-3.

KODRÍK, DALIBOR. Adipokinetic hormone functions that are not associated with insect flight. *Physiological Entomology*. 2008, **33**(3), 171-180. DOI: 10.1111/j.1365-3032.2008.00625.x. ISSN 03076962.

KODRÍK, Dalibor. *Fyziologie hmyzu: učební texty*. České Budějovice, 2004. Entomologický ústav Akademie věd České republiky a Biologická fakulta, Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích.

KODRÍK, Dalibor. Hormony a hormonální řízení antistresové odpovědi u hmyzu. *Živa. Academia*, 2014, (5), 206-208.

KODRÍK, Dalibor, Tereza STAŠKOVÁ, Veronika JEDLIČKOVÁ, František WEYDA, Radka ZÁVODSKÁ a Jitka PFLEGEROVÁ. Molecular characterization, tissue distribution, and ultrastructural localization of adipokinetic hormones in the CNS of the firebug *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera, Insecta). *General and Comparative Endocrinology*. 2015, **210**, 1-11. DOI: 10.1016/j.ygcen.2014.10.014. ISSN 00166480.

KODRÍK, Dalibor, Konstantin VINOKUROV, Aleš TOMČALA a Radomír SOCHA. The effect of adipokinetic hormone on midgut characteristics in *Pyrrhocoris apterus* L. (Heteroptera). *Journal of Insect Physiology*. 2012, **58**(1), 194-204. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2011.11.010. ISSN 00221910.

KRYUKOVA, N.A., I.M. DUBOVSKIY, E.A. CHERTKOVA, Ya. L. VORONTSOVA, I.A. SLEPNEVA a V.V. GLUPOV. The effect of *Habrobracon hebetor* venom on the activity of the prophenoloxidase system, the generation of reactive oxygen

species and encapsulation in the haemolymph of *Galleria mellonella* larvae. *Journal of Insect Physiology*. 2011, **57**(6), 796-800. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2011.03.008. ISSN 00221910.

KUBÍNEK, Roman, Klára ŠAFÁŘOVÁ a Milan VŮJTEK. *Elektronová mikroskopie*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2011. ISBN 978-80-244-2739-3.

LEE, Gyunghee a Jae H. PARK. Hemolymph sugar homeostasis and starvation-induced hyperactivity affected by genetic manipulations of the adipokinetic hormone-encoding gene in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 2004, **167**(1), 311-323.

LI, Chunjie, Shaomeng CHAI, Yongzhi JU, et al. Pu-erh tea protects the nervous system by inhibiting the expression of metabotropic glutamate receptor 5. *Molecular Neurobiology*. 2017, **54**(7), 5286-5299. DOI: 10.1007/s12035-016-0064-3. ISSN 0893-7648.

MACCHI, Marc, Najla EL FISSI, R. TUFI, M. BENTOBI, J.-C. LIEVENS, L. M. MARTINS, J. ROYET a T. RIVAL. The *Drosophila* inner-membrane protein PMI controls crista biogenesis and mitochondrial diameter. *Journal of Cell Science*. 2013, **126**(3), 814-824. DOI: 10.1242/jcs.115675. ISSN 0021-9533.

MEEUSEN, Shelly, Rachel DEVAY, Jennifer BLOCK, Ann CASSIDY-STONE, Sarah WAYSON, J. Michael MCCAFFERY a Jodi NUNNARI. Mitochondrial inner-membrane fusion and crista maintenance requires the dynamin-related GTPase Mgm1. *Cell*. 2006, **127**(2), 383-395. DOI: 10.1016/j.cell.2006.09.021. ISSN 00928674.

MILLER, Richard J. Mitochondria - the Kraken wakes. *Trends in Neurosciences*. 1998, **21**(3), 95-97.

NÄSSEL, Dick R. a Åsa M.E. WINTHER. *Drosophila* neuropeptides in regulation of physiology and behavior. *Progress in Neurobiology*. 2010, **92**(1), 42-104. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2010.04.010. ISSN 03010082.

NEBESÁŘOVÁ, Jana. Transmisní elektronový mikroskop. *Elektronová mikroskopie pro biology* [online]. 2001 [cit. 2019-02-21]. Dostupné z: <http://triton.paru.cas.cz/old-lem/book/>

PENNACCHIO, Francesco a Michael R. STRAND. Evolution of developmental strategies in parasitic Hymenoptera. *Annual Review of Entomology*. 2006, **51**(1), 233-258. DOI: 10.1146/annurev.ento.51.110104.151029. ISSN 0066-4170.

SHAIK, Haq Abdul, Archana MISHRA a Dalibor KODRÍK. Beneficial effect of adipokinetic hormone on neuromuscular paralysis in insect body elicited by braconid wasp venom. *Elsevier*. 2017, **196**, 11-18. DOI: 10.1016/j.cbpc.2017.02.011. ISSN 15320456.

SCHAFFER, Martin H., Barabara E. NOYES, Clive A. SLAUGHTER, Gareth C. THORNE a Simon J. GASKELL. The fruitfly *Drosophila melanogaster* contains a novel charged adipokinetic-hormone-family peptide. *The Biochemical Journal*. 1990, **269**(2), 315-320.

SLAVNOVA, T.I., S.M. ANTONOV, L.G. MAGAZANIK, A.K. TONKIKH, A.V. KOSOVSKII, A.A. SADYKOV, A.A. ABDUVAKHABOV. Effect of toxin from the venom of the ichneumon *Habrobracon hebetor* (Say) on neuromuscular transmission in insects. *Dokl. Akad. Nauk SSSR*. 1987, **297**, 492-494.

STONE, Judith V., William MORDUE, Karen E. BATLEY a Howard R. MORRIS. Structure of locust adipokinetic hormone, a neurohormone that regulates lipid utilisation during flight. *Nature*. 1976, **263**, 207-211.

SUMEDHA, Naorem Chanu a Selvaraj MILTONPRABU. Cardiac mitochondrial oxidative stress and dysfunction induced by arsenic and its amelioration by diallyl trisulphide. *Toxicology Research*. 2015, **4**(2), 291-301. DOI: 10.1039/C4TX00097H. ISSN 2045-452X.

VIGOREAUX, Jim O. Genetics of the *Drosophila* flight muscle myofibril: a window into the biology of complex systems. *BioEssays*. Burlington: Wiley, 2001, **23**(11), 1047-1063.

WESTERMANN, Benedikt. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2010, **11**(12), 872-884. DOI: 10.1038/nrm3013. ISSN 1471-0072.

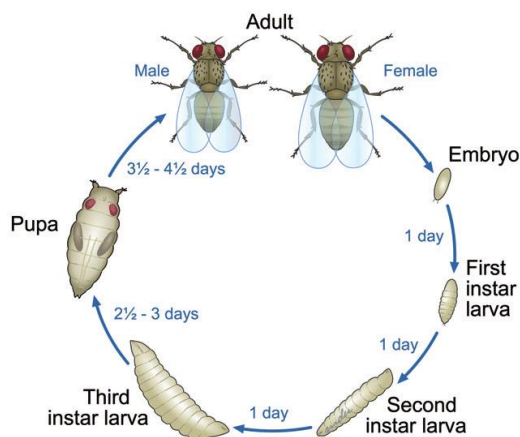
9 Přílohy

Příloha 1 Octomilka obecná, *Drosophila melanogaster*

Popis modelového organismu

D. melanogaster je dvoukřídleý 2–3 mm drobný hmyz s proměnou dokonalou. U octomilky se vyvinul pohlavní dimorfismus, samice je viditelně větší, její zadeček je špičatější s tmavým pruhováním. *Drosophila* se stala modelovým organismem z následujících důvodů. Její chov a křížení jsou snadné, má krátkou generační dobu, početné potomstvo a malý genom. Bylo popsáno a analyzováno 13 600 genů, celý genom obsahuje asi 116 milionů párů bází a díky tomu bylo možné vyšlechtit několik mutantních linií, mezi kterými je i mutantní kmen white, použitý v této práci, který má bílé oči.

Životní cyklus (Obr. P1) trvá 8–10 dní, délka záleží na teplotě, přičemž vyšší teplota cyklus urychluje. Stádia vývoje jsou vajíčko, larva, kukla a dospělec. Vajíčko je bílé o velikosti 0,5 mm a za den se z něho vylíhne 1. larvální stádium, to se další den změní v 2. larvální stádium trvajícím opět jeden den. Následuje 3. larvální stádium, které se za 2–3 dny zakuklí. Za další 3–4 dny se z kukly stane dospělec. Imaga žijí 40–50 dní, přičemž samička je schopna páření za 12 hodin od vylíhnutí a po 6–10 dnech klade až 300 vajíček (https://cit.vfu.cz/opvk2014/?title=teorie-modelovy_organismus&lang=cz).



Obr. P1: Životní cyklus octomilky, *Drosophila melanogaster*.

Stádia vývoje: vajíčko, 1. instar, 2. instar, 3. instar, kukla, dospělec.

Převzato z: https://www.researchgate.net/figure/The-whole-life-cycle-of-the-fruit-fly-Drosophila-is-relatively-rapid-and-takes-only_fig1_264127592.

Příprava potravy

polohrubá kukuřičná mouka	120 g v 1,4 l studené H ₂ O
cukr	75 g
potravinářské kvasnice.....	60 g
agar.....	15 g rozpustit ve 300 ml H ₂ O
10% NIPAGIN (methylparaben, Sigma)	
v 96% etanolu	50 ml

Kukuřičnou mouku s vodou mísíme 1 h v mixéru za teploty 90 °C. Poté přidáme cukr, kvasnice a rozpuštěný agar a mícháme dalších 45 min. Po uplynulé době snížíme teplotu na 70 °C. Po 10 min přidáme NIPAGIN (konzervant). Důkladně zamícháme. Rozléváme do čistých vialek po cca 3 ml. Tato dávka je na 256 vialek. Necháme vychladnout do druhého dne. Utěsníme buničitou vatou.

Příloha 2 Příprava použitých roztoků

Ringerův roztok

NaCl.....	7,5 g
KCl.....	0,1 g
CaCl ₂ ·2 H ₂ O	0,2 g
MgCl ₂ ·6 H ₂ O	0,4 g
NaHCO ₃	0,2 g

Navážené chemikálie rozpustit v 1 l H₂O. 2 h sterilizovat v peci při teplotě 100 °C.

Fixační médium glutaraldehyd (GA)

2,5% GA v PBS (pufrovaný fosfátový roztok – fyziologický)

8% zásobní roztok GA.....	30 ml
0,2M PBS.....	50 ml
H ₂ O	20 ml

Pryskyřice EPON

Složení pryskyřice o tvrdosti medium:

EPON.....	20 ml (24 g)
DDSA.....	16 ml (16 g)
NMA	8 ml (10 g)
BDMA (c 3%).....	1,3 ml (1,5 g)

Alkoholový nasycený roztok uranyl acetátu

- 2,6 g uranly rozpustit ve 20 ml 50% etanolu
- výsledný 0,3M uranyl acetát 2 h míchat
- 3x přefiltrovat přes stejný filtrační papír (v lednici)
- použití až druhý den
- uchování v tmavé lahvičce při 4°C

Citrát olova

- 0,02–0,04 g citrátu rozpustit ve 20 ml převařené H₂O
- přidat 0,2 ml 10N NaOH (40 g NaOH ve 100 ml H₂O)
- nechat rozpustit
- použití až druhý den
- uchování v tmavé lahvičce při 4°C
- před použitím zcentrifugovat (10 000 otáček/min po dobu 10 minut)
- pokud se objeví bílý zákal na dně, roztok je nepoužitelný
- použitelný nejvýše 3 týdny