JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Obranné reakce hmyzu vůči intoxikaci: modelový druh včela medonosná

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Nela Prokůpková

ŠKOLITEL: prof. RNDr. Dalibor Kodrík, CSc.

České Budějovice, 2022

Prokůpková, N., 2022: Obranné reakce hmyzu vůči intoxikaci: modelový druh včela medonosná. [Insect defense reactions against intoxication: model organism honeybee *Apis mellifera L.* Bachelor thesis, in Czech] – 34. p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

ANNOTATION

This bachelor thesis aimed to characterize the effect of imidacloprid (neonicotinoid insecticide) on nutrient levels (carbohydrates, proteins, lipids) in haemolymph, on the activity of digestive enzymes (amylases, proteases, lipases) in the gut, and on adipokinetic hormone and biogenic amine levels in the central nervous system of the worker honeybees *Apis mellifera*. The insecticide was applied topically to the bee body at a dose of 0,04 µg per bee. The above-mentioned characteristics were measured 24 hours after insecticide application. The results showed that the effect of imidacloprid on the nutrient level in haemolymph was variable – the level of carbohydrates and proteins decreased, while the level of lipids increased. The activity of digestive enzymes in the gut increased (proteases, lipases) after the application of imidacloprid. On the other hand, the levels of adipokinetic hormone and biogenic amines in the central nervous system were reduced.

PROHLÁŠENÍ

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

V Českých Budějovicích, dne 13. dubna 2022 ……..

Nela Prokůpková

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych zde poděkovala všem, kteří mi pomáhali při vypracování této bakalářské práce. Největší díky patří mému školiteli panu prof. RNDr. Daliboru Kodríkovi CSc., za odborné vedení, cenné rady, ochotu a také trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat celému týmu laboratoře Fyziologie hmyzu ENTÚ za poskytnutou pomoc a za vytvoření velice vřelého pracovního prostředí. Speciální díky patří paní Ing. Heleně Štěrbové za seznámení s prací v laboratoři a za veškerou pomoc poskytovanou v průběhu práce. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině za podporu v průběhu celého studia.

OBSAH

1 ÚVOD 1

1.1 BIOLOGICKÝ STRES 1

1.2 ANTISTRESOVÁ REAKCE 2

1.2.1 Antistresové reakce savců 2

1.2.2 Antistresové reakce hmyzu 3

1.2.2.1 Biogenní aminy 3

1.2.2.2 Adipokinetické hormony (AKH) 4

1.3 NEONIKOTINOIDNÍ INSEKTICIDY 5

1.4 VČELA MEDONOSNÁ (*APIS MELLLIFERA*) 7

1.4.1 Morfologie 7

1.4.2 Orgánové soustavy 8

2 CÍLE PRÁCE 10

3 MATERIÁLY A METODIKA 11

3.1 CHOV VČELY MEDONOSNÉ 11

3.2 APLIKACE IMIDACLOPRIDU 11

3.3 ODBĚR HEMOLYMFY 11

3.4 PITVA VČELÍCH ORGÁNŮ 11

3.4.1 Pitva střeva 12

3.4.2 Pitva mozku 12

3.5 MĚŘENÍ MNOŽSTVÍ ŽIVIN V HEMOLYMFĚ 12

3.5.1 Množství proteinů v hemolymfě 12

3.5.2 Množství lipidů v hemolymfě 13

3.5.3 Množství glycidů v hemolymfě 13

3.6 MĚŘENÍ AKTIVITY ENZYMŮ VE STŘEVĚ 14

3.6.1 Proteázová aktivita 14

3.6.2 Lipázová aktivita 15

3.6.3 Amylázová aktivita 15

3.7 STANOVENÍ HLADINY AKH V CNS – ELISA 16

3.8 STANOVENÍ MNOŽSTVÍ AMINŮ V CNS 17

3.9 STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ 18

4 VÝSLEDKY 19

4.1 MORTALITA VČEL V ZÁVISLOSTI NA DÁVCE IMIDACLOPRIDU 19

4.2 VLIV IMIDACLOPRIDU NA MNOŽSTVÍ ŽIVIN V HEMOLYMFĚ 20

4.2.1 Proteiny 20

4.2.2 Glycidy 21

4.2.3 Lipidy 21

4.3 VLIV IMIDACLOPRIDU NA AKTIVITU TRÁVICÍCH ENZYMŮ VE STŘEVĚ 22

4.3.1 Proteázy 22

4.3.2 Lipázy 23

4.3.3 Amylázy 23

4.4 VLIV IMIDACLOPRIDU NA HLADINU AKH V CNS 24

4.5 VLIV IMIDACLOPRIDU NA MNOŽSTVÍ AMINŮ V CNS 25

5 DISKUZE 26

6 ZÁVĚR 29

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 30

1 ÚVOD

1.1 Biologický stres

Problematika stresu je dnes velmi aktuální. Zabývají se jí obory jako medicína, psychologie, biologie nebo i ekologie. Termín stres však není jednoduché popsat a jeho přesná definice není doposud zcela jasná.

Jako první definoval stres Hans Selye (1936) ve svých studiích zabývajících se savci. A to jako nespecifickou reakci těla na jakýkoliv nežádoucí podnět (Fink, 2009). Předpokládal, že reakce na stres je univerzální fyziologická a behaviorální odpověď nazývaná obecný adaptační syndrom (GAS – general adaptive syndrome). Ten rozdělil do tří fází – poplachová, adaptační a fáze vyčerpání. Poplachová fáze funguje jako okamžitá reakce „fight or flight“. V adaptační fázi se organismus snaží minimalizovat dopad stresoru. V poslední fázi dochází k vyčerpání organismu a tělo se už není schopné působení stresoru bránit. Dnes už víme, že antistresová reakce není jednotná. Na základě typu, načasování a závažnosti aplikovaného stimulu může stres v těle vyvolat různé akce od změn homeostázy až po život ohrožující účinky a smrt (Yaribeygi a kol., 2017).

Všechny organismy musí udržovat komplexní dynamickou rovnováhu neboli homeostázu, která je neustále napadána vnitřními nebo vnějšími nepříznivými silami nazývanými stresory. Stres je definován jako stav ohrožení homeostázy, která je obnovena komplexním repertoárem fyziologických a behaviorálních adaptivních reakcí organismu. (Chrousos, 2009). Je známo, že různé chemické (pesticidy, léky, kovy, smog, abnormální koncentrace kyslíku atd.), fyzikální (záření, teplota, hluk, vibrace atd.) a fyziologické (nemoci, zranění, stárnutí, záněty atd.) podněty mohou působit jako stresory a narušit tak funkční homeostázu (Kodrík a kol., 2015). Jakákoliv odezva organismu na působení těchto stresorů se nazývá antistresová reakce. Ta může probíhat na molekulární, buněčné, fyziologické, ekologické nebo sociální úrovni. Jsou to právě antistresové reakce, které v těle vyvolávají katabolické procesy, a naopak tlumí procesy, které se záchranou bezprostředně nesouvisí.

Nejpodrobněji byl koncept stresu prozkoumán u savců prostřednictvím různých studií zabývajících se jejich fyziologickými i behaviorálními reakcemi. U savců jsou antistresové

reakce řízeny prostřednictvím nervové a endokrinní soustavy, konkrétně skrze hypotalamo-hypofýzární systém, jenž produkuje specifické hormony. V posledních letech se však ukazuje, že je to právě hmyz, který by mohl sloužit k dalšímu studiu antistresových reakcí. Ve stresových reakcích je nepochybně mnoho paralel mezi obratlovci a hmyzem, ať už v aktivovaných drahách, popř. v kontrolních systémech reakcí na stres (Adamo, 2012).

1.2 Antistresová reakce

V případě, že organismus čelí nějakému stresoru, je v jeho těle spuštěna antistresová odpověď, jejímž cílem je chránit daný organismus před nežádoucími vlivy stresoru. Tato odpověď se může projevit jako komplex buněčných, fyziologických nebo behaviorálních reakcí. Jsou to vysoce konzervativní reakce, které probíhají u většiny taxonů obratlovců včetně lidí jednotně (Möstl a Palme, 2002). V závislosti na druhu, intenzitě a délce působení stresoru se v organismu rozvíjejí různé fyziologické až patologické změny vedoucí k dočasnému nebo dlouhodobému narušení fyziologických mechanismů, v extrémních případech až ke smrti organismu (Yaribeygi a kol., 2017). Jak již bylo zmíněno, u většiny obratlovců jsou tyto reakce řízeny skrze nervovou a endokrinní soustavu.

1.2.1 Antistresové reakce savců

Antistresová odpověď savců je kontrolována dvěma hlavními antistresovými osami, sympato-adreno-medulární osou (SAM) a hypothalamo-hypofyzárně-adrenální osou (HPA).

SAM je řízena parasympatikem a podněcuje tvorbu katecholaminů (adrenalin, noradrenalin) v dřeni nadledvin. Tyto hormony jsou ve vyšší míře syntetizovány při stresových situacích a jejich úkolem je na ně organismus rychle připravit. Jelikož je tato osa zprostředkována hlavně neuronálním vedením, je velice rychlá. Její účinky můžeme pozorovat v řádu několika vteřin po začátku působení stresoru. V těle působí tyto hormony jako neurotransmitery sympatické části vegetativního systému. Adrenalin a noradrenalin se váží na α a β adrenergní receptory. Adrenalin skrze β-receptory zvyšuje srdeční frekvenci a sílu stahu srdečního svalu. Noradrenalin prostřednictví α-receptorů vyvolává vazokonstrikci v periferních tkáních, čímž zvyšuje krevní tlak. Aktivace této osy způsobuje i metabolické změny zajišťující potřebnou energii pro mozek,

kosterní svaly a další orgány. Tato energie je zprostředkována pomocí aktivace glykogenolýzy v játrech a navýšení obsahu volných mastných kyselin a laktátu v plazmě.

Hypothalamo-hypofyzárně-adrenální osa (HPA) může být spuštěna dvěma mechanismy. Buď je hypothalamus stimulován aktivací SAM osy, tedy adrenalinem. Nebo dochází k její aktivaci přímo skrze smyslové dráhy, které objevily stresor (v tomto případě nemusí být nutně aktivována osa SAM). Tato osa je vzhledem ke svému charakteru pomalejší a její nástup trvá v řádu několika minut, na druhou stranu má však déle trvající efekt. Paraventrikulátní jádro hypothalamu produkuje kortikoliberin (peptidický hormon), který stimuluje hypofýzu k tvorbě ACTH (adrenokortikotropní hormon). ACTH následně stimuluje kůru nadledvin ke zvýšené produkci glukokortikoidů. Glukokortikoidy putují krevním řečištěm a působí zde na cílové tkáně spouštějící obranné reakce (mobilizují energii, tlumí trávicí procesy a inhibují imunitní reakce). HPA osa je přísně regulována samotným hypothalamem pomocí negativní zpětné vazby. Glukokortikoidy se vážou na své receptory v centrální nervové soustavě a hypothalamus tak dostává informaci o tom, jaká je jejich hladina v krvi.

1.2.2 Antistresové reakce hmyzu

Hmyzí antistresové reakce jsou řízeny velmi podobně jako je tomu u savců. Pokud je organismus vystaven nějakému stresoru jsou z centrální nervové soustavy vyplavovány hormony oktopamin a dopamin. Tyto hormony jsou strukturně příbuzné adrenalinu a noradrenalinu a hrají podobné fyziologické role. K uvolnění těchto hormonů dochází velice rychle. Dále pak následuje uvolnění adipokinetických hormonů (AKH) z endokrinní žlázy *corpora cardiaca*.

1.2.2.1 Biogenní aminy

Biogenní aminy hrají zásadní roli v regulaci základních životních procesů (Farooqui, 2012). U hmyzu můžeme najít oktopamin, dopamin, histamin, serotonin nebo tyramin. Role biogenních aminů jako hormonů a neurotransmiterů v akutní stresové reakci je u obratlovců velice dobře zdokumentována. Ukazuje se, že i u hmyzu hrají biogenní aminy podstatnou roli v antistresové odpovědi organismu. Výzkum například ukázal, že oktopamin a dopamin se uvolňují do hmyzí hemolymfy v prvních minutách po vystavení stresu, což vyvolává kaskádu reakcí vedoucích k opětovnému dosažení homeostázy (Gruntenko a kol., 2016). Biogenní aminy se váží na receptory

spojené s G-Proteinem (GPCR) a v závislosti na typu receptoru a cílové tkáni stimulují různé typy sekundárních poslů, zejména cAMP nebo Ca^{2+} (Farooqui, 2012).

1.2.2.2 Adipokinetické hormony (AKH)

Adipokinetické hormony hrají klíčovou roli v řízení energetického metabolismu hmyzu. Antistresovou aktivitu AKH lze v hmyzím těle sledovat především v základní metabolické rovině, ale projevuje se i na biochemické, fyziologické nebo dokonce behaviorální úrovni. Všechny reakce se vzájemně doplňují a koordinují – výsledkem je komplexní antistresová odpověď organismu (Kodrík a kol., 2015). AKH jsou však pleiotropní hormony, protože zasahují i do dalších energeticky náročných procesů jako je svlékání, reprodukce, růst, hladovění a diapauza (Gäde, 1990). Byly popsány u desítek zástupců všech významných hmyzích řádů a dnes jich známe kolem 60 forem. Jednotlivé formy se liší složením aminokyselin a patří do tzv. AKH/RPCH peptidické rodiny (adipokinetic hormone/ red pigment concentrating hormone family). Všechny hormony z AKH/RPCH rodiny se skládají z 8 až 10 aminokyselin s jedinou výjimkou, AKH z motýla *Vanessa cardui* obsahuje 11 aminokyselin (Kollisch a kol., 2000).

Adipokinetické hormony jsou metabolické neurohormony vylučované neurosekretorickými buňkami endokrinní žlázy *corpora cardiaca*. *Corpora cardiaca* jsou přímo spojena s mozkem, slouží jako neurohemální orgán, syntetizují však i vlastní hormony. AKH stimulují buňky tukového tělesa, které je obdobou savčích jater. Zde dochází k mobilizaci energetických zásob organismu, a zároveň dochází k útlumu veškerých syntetických procesů. Adipokinetické hormony se zde váží na specifické receptory spřaženými s G-proteiny, které prostřednictvím druhého posla (cyklický adenosinmonofosfát, diacylglycerol, inositoltrifosfát, vápenaté ionty) aktivují různé buněčné kaskády vedoucí k mobilizaci energie prostřednictvím mobilizace lipidů nebo glycidů. Mechanismus působení AKH na buněčné úrovni je substrátově specifický (Gäde a kol., 1997).

Při mobilizaci lipidů se po navázání AKH na receptor interagující s G-proteinem stává druhým poslem cAMP (cyklický adenosinmonofosfát). Ten za přítomnosti vápenatých iontů spustí proteinkinázovou kaskádu, jež ve finálním kroku štěpí triaglycerol na diaglycerol (DAG). DAG (nejběžnější transportní forma lipidů u hmyzu) je skrze cytoplazmatickou membránu vyplavován

do hemolymfy a transportován k cílovým tkáním (svaly), kde je rozložen na mastné kyseliny a glycerol (Gäde a Auerswald, 2003).

Poněkud jiný mechanismus vede k mobilizaci zásob glycidů. Po navázání AKH na receptor a aktivaci G-proteinu je stimulována fosfolipáza C. Ta má za úkol štěpení inositolového fosfolipidu na inositoltrifosfát a DAG (diaglycerol). Inositoltrifosfát uvolňuje vápenaté ionty z endoplazmatického retikula a ty spolu s DAG spouští proteinkinázovou kaskádu. Ta dále aktivuje glykogen fosforylázu, jejímž úkolem je štěpit glykogen na glukózu. Ta je následně přeměněna na trehalózu, která putuje hemolymfou a v cílových tkáních slouží jako zdroj energie (Gäde a Auerswald, 2003).

Tukové těleso však není jedinou cílovou tkání adipokinetických hormonů (Kodrík, 2008). AKH také stimulují činnost srdce. Při zvýšené aktivitě srdeční činnosti dochází k rychlejšímu přesunu živin i hormonů v hemolymfě, což zapříčiňuje mnohem rychlejší metabolickou odpověď. Dále také dochází ke stimulaci svalů a pohybové aktivity. V neposlední řadě dochází i ke zvýšení činnosti střevních enzymů. Tato funkce se však projevuje až po delší době od působení stresoru a zajišťuje doplnění energetických zdrojů, které byly spotřebovány při antistresové reakci. Uvolňování AKH z *corpora cardiaca* do hemolymfy je zpravidla kontrolováno zpětno-vazebně hladinou metabolitů. Po ukončení působení dojde k deaktivaci AKH v hemolymfě pomocí endopeptidáz (Gäde a kol., 1997).

U včely medonosné *Apis mellifera* (viz níže) můžeme najít pouze jednu formu adipokinetického hormonu. Hormon je označován jako Schgr-AKH-II (protože byl původně popsán u *Schistocerca gregaria* (Gäde a kol., 1986)) a je složen z devíti aminokyselin v podobě – pGlu-Leu-Thr-Phe-Thr-Ser-Ser-Trp-Gly-NH_2 (Marchal a kol., 2018).

1.3 Neonikotinoidní insekticidy

Insekticidy jsou přípravky primárně určené k hubení hmyzu nebo jeho odpuzování. Užívají se v zemědělství, lesnictví i v domácnostech. Mohou to být látky přírodního původu jako například neemový olej nebo pyrethrum. Mnohem častěji se však setkáváme s chemickými insekticidy. Syntetických insekticidů je celá řada (karbamáty, organofosfáty, neonikotinoidy nebo pyrethroidy), liší se obsaženou účinnou látkou a způsobem aplikace. Chemické insekticidy jsou

důležité pro produktivitu plodin v systémech intenzivního zemědělství, kde zachovávají asi jednu pětinu výnosu plodin (Oerke a Dehne, 2004).

Neonikotinoidní insekticidy, jako je imidacloprid, klothianidin, thiamethoxam a thiacloprid, patří mezi nejdůležitější chemikálie v ochraně plodin (Elbert a kol., 2008). V posledním desetiletí byly neonikotinoidní insekticidy nejrychleji rostoucí třídou insekticidů v moderní ochraně plodin kvůli použití proti širokému spektru škůdců (Jeschke a kol., 2011). Neonikotinoidy mají relativně nízké riziko pro necílové organismy a životní prostředí, vykazují vysokou cílovou specifitu pro hmyz a všestrannost v aplikačních metodách (Cresswell, 2011). Jsou to systémové insekticidy, rostlina látku vstřebává při klíčení a rozvadí ji dále po těle. Tak je dosaženo toho, že insekticid je specificky dodáván škůdcům požírajícím tkáně rostlin. Jejich název doslova znamená „new nicotine-like insecticides“, jelikož chemicky jsou neonikotinoidy odvozené od molekuly nikotinu.

Nikotin izolovaný z rostlin tabáku (*Nicotiana tabacum*) se po staletí používá jako systémový insekticid proti savému hmyzu (Seifert a Stollberg, 2005). Jelikož je ale nikotin toxický i pro savce, bylo hlavním cílem při vývoji nových insekticidů zvýšit jejich specificitu pro hmyz. Neonikotinoidy působí na postsynaptické acetylcholinové receptory (nAChR). U savců i u hmyzu můžeme najít několik typů těchto receptorů. U hmyzu jsou tyto receptory umístěny přímo v centrální nervové soustavě, savčí nAChR receptoru se nacházejí v mozku, autonomních gangliích, kosterním svalstvu a míše. Selektivní toxicita neonikotinoidů u hmyzu a savců je z velké části připisována rozdílné citlivosti podtypů nAChR hmyzu a obratlovců. U hmyzu působí neonikotinoidy na alespoň tři různé podtypy nAChR a způsobují dvoufázovou odezvu, tj. počáteční zvýšení frekvence spontánního výboje následované úplným blokováním šíření nervového vzruchu (Gupta a kol., 2019).

Imidacloprid je nejznámějším a nejpoužívanějším zástupcem neonikotinoidních insekticidů. Je to širokospektrální neonikotinoidní insekticid s vynikající systémovou a kontaktní aktivitou, která podporuje jeho použití na mnoha potravinářských plodinách, trávnicích, okrasných rostlinách a pro hubení hmyzu v domácnostech (Krieger, 2010). Při perorálním podání člověku se imidacloprid rychle vstřebává, metabolizuje se primárně v játrech a vylučuje se močí. Imidacloprid se nehromadí v těle, není karcinogenní, mutagenní, teratogenní ani toxický pro

reprodukci. Míra bezpečnosti imidaclopridu je vysoká díky jeho insekticidní specifitě a nízké toxicitě pro savce (Sheets, 2010).

1.4 Včela medonosná (*Apis melllifera*)

Včela medonosná je zástupcem blanokřídlého hmyzu (*Hymenoptera*). Z celé početné třídy hmyzu má největší význam pro opylování rostlin. Odhaduje se, že se podílí na zajištění cizosprašného hmyzosnubného opylování rostlin z 95 %. Zbývajících 5 % zajišťují čmeláci, samotářské včely a ostatní příležitostně opylující hmyz (Veselý a kol., 2003). V posledních letech však dochází k častým úhynům včelstev. Včelaři z různých geografických oblastí hlásili výrazné zvýšení míry selhání včelstev a počtu stresorů ovlivňujících včely, včetně nemocí, parazitů, pesticidů a špatné výživy (Ratnieks a Carreck, 2010).

1.4.1 Morfologie

Tělo včely medonosné je tvořeno třemi částmi – hlava, hruď a zadeček. Jednotlivé části těla jsou volně spojeny a umožňují tak včele větší flexibilitu pohybu. Vnější kostra včely je tvořena pokožkou skládající se ze tří vrstev – a to z kutikuly, epidermis a podstavné blány. I samotná kutikula se dále dělí na tři vrstvy. Tyto vrstvy nemají buněčnou strukturu, ale obsahují drobné póry propojující povrch těla s epidermis. První dvě vrstvy jsou slabší, svrchní voskovitá vrstva se nazývá epikutikula a pod ní se nachází exokutikula obsahující melanin (zajišťuje zbarvení). Endokutikula je nejsilnější vrstva tvořená z mnoha vrstev chitinu a proteinů. Kutikula slouží jako opora těla a k ochrana vnitřních orgánů.

Hlava včely je tvořena šesti plně srostlými články. S tělem je spojena tenkým krkem, jímž prochází hltan, aorta, nervová páska, vzdušnice a vývody různých žláz. První až třetí článek se nazývá *procephalon* a je zde uložen mozek. Čtvrtý až šestý článek se nazývá *gnathocephalon*. Hlava nese řadu důležitých smyslových orgánů. V její přední části se nacházejí dvě složené oči sloužící k vidění, a tři jednoduchá očka (ocelli), která reagují pouze na světelné dráždění. Na hlavě jsou také přítomna tykadla přirostlá k čelní straně hlavy tenkou membránou. Tykadla reagují na pachové, chemické i hmatové podněty. Na čtvrtém až šestém článku se nacházejí kusadla, čelisti a spodní pysk. Čelisti a spodní pysk tvoří dohromady sosák, což je pohyblivá

ochlupená část trávicího ústrojí. Kusadla jsou velmi pevná, silně inkrustovaná, a proto jsou velmi ostrou a silnou částí trávicího ústrojí (Přidal, 1996).

Včelí hruť je tvořena srůstem tří hrudních a jednoho bederního článku. Je rozdělena na předohruď (prothorax), středohruď (mesothorax) a zadohruď (metathorax). Na rozdíl od hlavy jsou hranice jednotlivých hrudních článků rozlišitelné a nesou pohybové orgány (nohy a křídla). Báze obou párů blanitých křídel přisedají na články předohrudi a zadohrudi. Křídla jsou pokryta kutikulou s drobnými chloupky a prochází jimi vzdušnice (dýchací orgán). Nemají vlastní svalstvo, jejich pohyb je zajištěn pomocí hrudních létacích svalů. Dále se na hrudi nacházejí tři páry článkovaných nohou, každý pár na jednom článku.

Největší částí těla včely je zadeček, zde se nachází většina životně důležitých orgánů jako je trávicích soustava s medovým váčkem, tukové těleso, Malpighické trubice, pohlavní ústrojí a různé žlázy. Jednotlivé články zadečku jsou jasně viditelné a vzájemně se překrývají.

1.4.2 Orgánové soustavy

Na řízení organismu se podílí nervová a endokrinní soustava. Nervová soustava včely je gangliová, skládá se z mozku, břišní nervové pásky a periferní nervové soustavy. Mozek je nejsložitější částí nervové soustavy, je složen ze dvou hemisfér spojených střední částí. Jsou v něm uložena zraková centra a houbovitá tělíska (*corpora pedunculata*). Ta představují tzv. asociační centra, jsou to centra instinktů, reflexů a celkově „vyšších“ nervových projevů včel. Včela jako eusociální hmyz má tato centra dobře vyvinuta a v průběhu života může docházet k jejich zvětšování. Kontakt s okolím zprostředkovávají smyslové orgány v podobě chemoreceptorů, mechanoreceptorů, termoreceptorů a fotoreceptorů. Endokrinní systém hmyzu patří nejdokonalejším a nejlépe prozkoumaným endokrinním systémům bezobratlých. Jeho osu tvoří dvě hlavní endokrinní centra – neurosekretorický systém mozku spojený se žlázami *corpora cardiaca* a *corpora allata*, a prothorakální žlázy (Kodrík a kol., 2015).

Včela má otevřenou cévní soustavu, tvořenou srdcem a hlavní cévou. Koncem cévy se pak hemolymfa dostává volně do tělní dutiny, kde omývá vnitřní orgány. Dýchání probíhá pomocí vzdušnic a svalů na zadečku. Malpighické trubice zajišťují vylučování včel.

Trávicí soustava má za úkol zachytit potravu, zpracovat ji, předat získané živiny cévní soustavě a vyloučit nestrávené zbytky ven z těla. Trávicí soustava včely je složena ze tří části: přední (*stomodeum*), střední (žaludek, *mesenteron*) a zadní (*proctodeum*). Vstup do trávicí soustavy je tvořen ústy (*os*), následuje hltan (*pharynx*) a jícen (*oesophagus*). Pomocí okružních a podélných svalů dochází ke stahování hltanu a tím i nasávání potravy sosákem. Zde se také potrava mísí s výměšky hltanové žlázy. Skrze jícen je potrava posouvána stejně jako je tomu u hltanu, pomocí svalů. V zadečku se jícen rozšiřuje do útvaru zvaného medný váček. V něm dochází vlivem výměšků hltanových žláz k přeměně nektaru na med. Jediná včela nemá na vytvoření medu dostatek výměšků žláz. Nektar tedy zpětně vyvrhuje a předává další včele. Tento postup je opakován do vytvoření pravého medu. Mezi medným váčkem a žaludkem se nachází tzv. česlo. Česlo reguluje průchod potravy do žaludku (trubičkovitý konec česla) a zároveň brání zpětnému posunu potravy do medného váčku (hlava česla). Určuje tak, kolik potravy bude zpětně vyvrhnuto a kolik potravy bude použito k vlastnímu trávení. Vnitřek žaludku je chráněn peritrofickou membránou. Membrána také zpomaluje postup potravy a zajišťuje tak lepší trávení. Konec trávicí soustavy představuje konečník neboli výkalový vak. Zde se hromadí nestrávené zbytky zadržované v průběhu zimy.

2 CÍLE PRÁCE

Cílem této bakalářské práce bylo sledování fyziologických procesů probíhajících v těle včely medonosné *A. mellifera* po aplikaci imidaclopridu (neonikotinoidní insekticid). Práce zahrnovala následující:

1. Stanovení množství živin (glycidy, proteiny, lipidy) v hemolymfě
2. Sledování změn v aktivitě trávicích enzymů (proteázy, amylázy, lipázy) ve střevě
3. Sledování změn hladiny adipokinetického hormonu v CNS
4. Sledování změn hladiny aminů (dopamin, histamin) v CNS

3 MATERIÁLY A METODIKA

3.1 Chov včely medonosné

Včely používané k této práci byly odebírány z včelnice Biologického centra AVČR v Českých Budějovicích.

3.2 Aplikace imidacloprid

Insekticid imidacloprid byl narkotizovaným včelám aplikován topikálně v acetonu na přední dorsální část abdomenu pomocí mikropipety; kontroly obdržely stejnou dávku čistého acetonu.

- Pro stanovení vhodné pokusné dávky pomocí mortality byl imidacloprid aplikován v množství 0,02-0,40 µg na včelu vždy ve 4 µl roztoku (pro každou dávku bylo použito 20 jedinců).

- Pro posouzení vlivu imidaclopridu na fyziologické parametry byla vybrána dávka 0,04 µg na včelu (viz kap. 4. Výsledky), pro každou skupinu bylo použito 8–10 jedinců.

V obou případech byly včely po ošetření přesunuty do speciálních klícek, které byly umístěny do inkubátoru o teplotě 38 °C. Po 24 hodinách byly včely usmrceny mrazem a použity k dalším stanovením.

3.3 Odběr hemolymfy

Včelám narkotizovaným oxidem uhličitým byla narušena kutikula na laterální straně abdomenu pomocí jehly. Mikro-kapilárou byla zachycena vytékající hemolymfa a přenesena do mikrozkumavky udržované na ledu. Takto získané vzorky byly uchovávány v -20°C do dalšího použití. Při odběru bylo nutné udržovat získanou hemolymfu v chladu, aby nedošlo k její melanizaci.

3.4 Pitva včelích orgánů

Pitvané včely byly nejdříve narkotizovány pomocí oxidu uhličitého a následně přeneseny na led. Pitvy byly prováděny pod binokulárním mikroskopem na voskové destičce v Ringerově fyziologickém roztoku. Ringerův roztok zabraňoval vysychání pitvaných orgánů a nahrazoval

přirozené fyziologické prostředí. K pitvě byly dále použity špendlíky, pitevní pinzety a chirurgické nůžky.

Ringerův roztok:
7,5 g NaCl, 0,1 g KCl, 0,2 g $CaCl_2 \cdot H_2O$, 0,4 g $MgCl_2 \cdot H_2O$, 0,2 g $NaHCO_3$ na 1 litr destilované vody

3.4.1 Pitva střeva

Narkotizovaná včela byla upevněna špendlíkem k pitevní voskové misce dorzální stranou dolů. Následně byla chirurgickými nůžkami podélně rozstřižena tělní stěna na ventrální straně abdomenu. Střevo bylo vyjmuto pomocí pitevních pinzet, umístěno do mikrozkumavky a zváženo. Střevo bylo uchováváno v -20°C do dalšího použití.

3.4.2 Pitva mozku

Včele byla ustřižena hlava a připevněna pomocí špendlíku k voskové destičce dorzální stranou dolů. Pinzetou byla natržena kutikula po celém obvodu hlavy a následně byla odstraněna. Mozek byl spolu s endokrinním orgánem *corpora cardiaca* vyjmut a umístěn do mikrozkumavek s 200 µl 80 % methanolu. Vzorky byly uchovány v -20°C do dalšího použití.

3.5 Měření množství živin v hemolymfě

3.5.1 Množství proteinů v hemolymfě

Test pro stanovení hladiny proteinů v hemolymfě byl prováděn podle práce Stoscheck (1990). K testu byl použit kit BCA (Bicinchoninic acid) protein Assay (Sigma Aldrich).

Reagencie:

- Reagencie A (pH 11,25, Sigma Aldrich) - 1 g sodium bicinchoninade, 2 g Na_2CO_3, 0,16 g $C_4H_4Na_2O_4$, 0,4 g NaOH, 0,95 g $NaHCO_3$ na 100 ml destilované vody
- Reagencie B (pH 7,8, Sigma Aldrich) - $CuSO_4 \cdot H_2O$ na 10 ml destilované vody
- 0,2M tris (pH 7,8)

Postup:

Do mikrozkumavek bylo napipetováno 49 µl tris a 1 µl hemolymfy. Následně byl ke vzorku přidán 1 ml reakční směsi (reakční směs - 50 dílů reagencie A a 1 díl reagencie B). Jako blank bylo použito 50 µl destilované vody a 1 ml reakční směsi. Vzorky byly promíchány a inkubovány 30 minut při 60 °C. Po vychladnutí bylo z každé mikrozkumavky přeneseno 200 µl roztoku do jamek mikrodestičky. Absorbance byla měřena na ELISA readeru (Molecular Devices) při vlnové délce 562 nm. Pro vyhodnocení výsledků byla použita kalibrační křivka BSA (bovinní sérum albumin) v rozmezí 5–50 µg BSA.

3.5.2 Množství lipidů v hemolymfě

Test pro stanovení hladiny lipidů v hemolymfě byl prováděn podle práce Zöllner a Kirsch (1962), modifikované dle práce Kodrík a kol. (2000).

Reagencie:

- 96% H_2SO_4
- Vanilínové reagens – 1,98 g vanilínu (Sigma Aldrich) v 668 ml H_3PO_4

Postup:

Do skleněných zkumavek bylo napipetováno 100 µl kyseliny sírové a 1 µl hemolymfy. Jako blank bylo použito 100 µl kyseliny sírové. Vzorky byly následně povařeny 10 minut při 100 °C. Po vychladnutí byl ke každému vzorku přidán 1 ml fosfovanilinové reagens a vzorky byly prudce promíchány. Po uplynutí 30 minut bylo z každé zkumavky přepipetováno 200 µl roztoku do jamek mikrodestičky. Absorbance byla měřena na ELISA readeru (Molecular Devices) při 546 nm. Pro vyhodnocení výsledků byla použita kalibrační křivka kyseliny olejové v rozmezí 1,412-56,5 µg kyseliny olejové.

3.5.3 Množství glycidů v hemolymfě

Test pro stanovení hladiny glycidů v hemolymfě byl prováděn podle práce Carol a kol. (1956).

Reagencie:

- Destilovaná voda

- Anthronová reagens - 150 mg anthronu (Sigma Aldrich) ve 100 ml 70% H_2SO_4

Postup:

Do mikrozkumavek bylo napipetováno 160 µl destilované vody a 0,5 µl hemolymfy. Následně bylo do zkumavek přidáno 230 µl anthronové reagens a vzorky byly inkubovány 8 minut při 100 °C. Jako blank byl použit vzorek obsahující 160 µl destilované vody a 230 µl anthronové reagens. Po vychladnutí bylo přeneseno 200 µl z každého vzorku do jamek mikrodestičky. Absorbance byla měřena na ELISA readeru (Molecular Devices) při vlnové délce 620 nm. Pro vyhodnocení výsledků byla použita kalibrační křivka glukózy v rozmezí 0,45–14,4 µg glukózy.

3.6 Měření aktivity enzymů ve střevě

Pro měření aktivity enzymů ve střevě byla použita vypitvaná střeva. Vzorky byly rozsonikovány ve 200 µl 0,2M trisu (pH 7,8) a stočeny (5 minut, 10 000 otáček). Následně byl odebrán supernatant do čistých mikrozkumavek a vzorky byly uchovány v -20 °C k dalšímu použití.

3.6.1 Proteázová aktivita

Test aktivity proteáz ve střevě byl prováděn za použití resorufin-kaseinovému kitu od firmy Roche.

Reagencie:

- 0,4% resorufin-kasein ve vodě
- 0,2M tris (pH 7,8)
- 0,02M $CaCl_2$
- 5% CCl_3COOH (TCA)

Postup:

Do mikrozkumavek byly postupně napipetovány předem připravené reagencie. V každém zkumavce bylo smícháno 20 µl substrátu resorufin-kasein, 40 µl 0,2M trisu, 20 µl 0,2M $CaCl_2$ a 20 µl extraktu ze střeva (ekvivalent 0,1 střeva). Jako blank byl použit roztok obsahující 20 µl substrátu resorufin-kasein, 40 µl 0,2M trisu a 20 µl 0,2M $CaCl_2$. Vzorky byly inkubovány při teplotě 37 °C. Po jedné hodině byla inkubace přerušena a ke každému vzorku bylo přidáno 240 µl 5% kyseliny trichloroctové. Poté byly vzorky dále inkubovány po dobu 10 minut při 37 °C.

Následně byla provedena centrifugace vzorků (3 minuty při 10 000 otáčkách) a z každé mikrozkumavky bylo přepipetováno 200 µl supernatantu do ELISA mikrodestičky. Absorbance byla měřena na ELISA readeru (Molecular Devices) při vlnové délce 490 nm. Výsledky byly vyhodnoceny jako relativní absorbance na miligram hmotnosti střeva.

3.6.2 Lipázová aktivita

Test lipázové aktivity byl proveden podle práce Robertse (1985).

Reagencie:

- 50mM 4MU-burytate (M=246,26) - 0,0123 g v 1 ml DMSO
- 0,2M tris (pH 7,8)

Postup:

Do tmavé mikrodestičky bylo napipetováno 5 µl extraktu ze střeva (ekvivalent 0,025 střeva) a 190 µl 0,2 M tris. Do každé jamky bylo v přítmí napipetováno 5 µl 25x zředěného 50mM 4MU-burytate (ředěno v DMSO). Jako blank bylo použito 195 µl 0,2M tris a 5 µl zředěného 50mM 4MU-burytate. Následně byla měřena kinetická fluorescence při 327/449 exc/em na přístroji značky Biotek. Pro vyhodnocení byly výsledky přepočítány na nmol 4 MU/miligram hmotnosti střeva ($F_{30\ min} - F_{0\ min}$ x 0.19849).

3.6.3 Amylázová aktivita

Test amylázové aktivity byl proveden podle práce Bernfelda (1955).

Reagencie:

- 2% škrob rozpustný ve vodě
- DNS reagent – 0,0125 g DNS (kyselina 3,5 dinitrosalicilová), 7,5 g $KNaC_4H_4O_6 \cdot 4\ H_2O$, 0,4 g NaOH na 25 ml destilované vody
- Fosfátový pufr (pH 5,7) – 2,722 g KH_2PO_4 na 100 ml destilované vody (A), 0,716 g na 100 ml destilované vody (B), mícháme 93,5 ml A + 6,5 ml B
- 20mM NaCl

Postup:

Do mikrozkumavek bylo postupně přidáno 25 µl extraktu vzorku ze střeva (ekvivalent 0,125 střeva), 25 µl 2% roztoku škrobu a 25 µl fosfátového pufru. Takto připravené vzorky byly inkubovány 1 hodinu při 30 °C, následně byla probíhající reakce zastavena pomocí kyseliny 3,5-dinitrosalicylové. Dále byly vzorky inkubovány po dobu 5 minut při 100 °C a centrifugovány (10 minut při 10 000 otáčkách). Z každé mikrozkumavky bylo do ELISA mikrodestičky přepipetováno 200 µl supernatantu. Absorbance byla měřena na ELISA readeru (Molecular Devices) při vlnové délce 550 nm. Pro vyhodnocení byly výsledky přepočteny na množství maltózy/miligram hmotnosti střeva.

3.7 Stanovení hladiny AKH v CNS – ELISA

Protilátky:

Primární protilátka: Rabbit anti-Schgr AKH II antisérum (Pineda – Berlín, Německo)

Sekundární protilátka: HRP (Horseradish peroxidase) Swine anti-rabbit IgG antisérum (Pineda – Berlín, Německo)

Reagencie:

- 80% methanol
- Promývací pufr (pH 7,5) - 10mM PBS (zásobní roztok $NaH_2PO_4 \cdot 12\ H_2O$, KH_2PO_4, ředění 1:9) + 0,1 ml Tween na 100 ml 10mM PBS
- Blokovací pufr - 1 g Skim milk Powder (Sigma – Aldrich) na 20 ml promývacího pufru
- Aplikační pufr (pH 9,6) – 0,424 g Na_2CO_3, 0,504 g $NaHCO_3$ na 100 ml destilované vody
- Substrát Sigma T444 (3 3‘5 5‘- tetramethylbenzidine)
- 0,5M H_2SO_4 (PENTA, 20450-12500)

Postup:

K extrakci AKH z CNS byly použity předem připravené mikrozkumavky obsahující včelí mozek spolu s endokrinním orgánem *corpora cardiaca* a 200 µl methanolu. Vzorky byly sonikovány a stočeny (5 minut při 10 000 otáčkách). Po centrifugaci byl supernatant odebrán do čistých mikrozkumavek. K vzniklému peletu bylo opět přidáno 200 µl methanolu a celý postup byl opakován. Oba vzniklé supernatanty byly přepipetovány do jedné mikrozkumavky a následně z nich byl methanol odpařován ve vakuové centrifuze (Concentrator 5301).

Po odpaření byl vzniklý odparek rozmělněn pomocí vaničkového sonikátoru ve 100 µl aplikačního pufru. Vzorky obsahující ekvivalent jedné CNS rozpuštěné ve 100 µl aplikačního pufru byly v tomto množství nanášeny do jamek mikrodestičky. Jako blank bylo použito 100 µl aplikačního pufru. Na destičku byla spolu se vzorky nanesena i kalibrační řada standardu hormonu Schgr-AKH II. Hormon byl ředěn dvojkovou řadou s počáteční dávkou 10 pmol do hodnoty 0,156 pmol. Destička byla přelepena fólií (bránící kontaminaci a vysychání vzorků) a umístěna na 24 hodin do 4 °C. Po 24 hodinách byla každá jamka obsahující vzorek třikrát promyta 200 µl předem připraveného promývacího pufru. Následně bylo ke každému vzorku napipetováno 200 µl blokovacího pufru a destička umístěna na 2 hodiny do 37 °C. Dále bylo zopakováno promývání a ke vzorkům bylo přidáno 100 µl roztoku primární protilátky (ředění 1:5000 v promývacím pufru). Vzorky byly inkubovány 1 hodinu při 37 °C. Po inkubaci bylo opět zopakováno promývaní, ke vzorkům bylo přidáno 100 µl roztoku sekundární protilátky (ředění 1:5000 v promývacím pufru) a vzorky byly dále inkubovány jednu hodinu ve 37 °C. Destička byla šestkrát promyta promývacím pufrem. Následně bylo ke vzorkům přidáno 100 µl substrátu Sigma T444, 3 3‘5‘5‘-tetramethylbenzidinu, celá destička byla zabalena do alobalu (kvůli fotosenzitivitě substrátu) a umístěna na dobu 40 minut do 37 °C. Pro zastavení reakce bylo ke každému vzorku přidáno 50 µl 0,5M kyseliny sírové. Absorbance byla měřena na ELISA readeru (Molecular Devices) při vlnové délce 450 nm.

3.8 Stanovení množství aminů v CNS

Hladina aminů byla stanovena ve spolupráci s Katedrou biochemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

Postup:

Mozky včely medonosné (3 mozky na vzorek) byly extrahovány v 80% methanolu, extrakty byly následně odpařeny ve vakuové odparce. Následně byly vzorky rozpuštěny v mobilní fázi a byly k nim přidány izotopově značené standardy: Histamine-D4 a Dopamine-D4 (Cambridge Isotope Laboratories, Inc., UK). Chromatografická separace v mobilních fázích A: voda a B: acetonitril na systému Dionex Ultimate 3000 UHPLC system (Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, USA) na koloně Restek Raptor Polar 2,7 um, 100 x 2,1 mm při teplotě 30 °C. Hmotnostně spektrometrická detekce byla provedena na systému Compact qTOF (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) s ESI

ionizací. Hladiny analytů byly spočítány na základě externí kalibrace se standardy a deuterovány interními standardy.

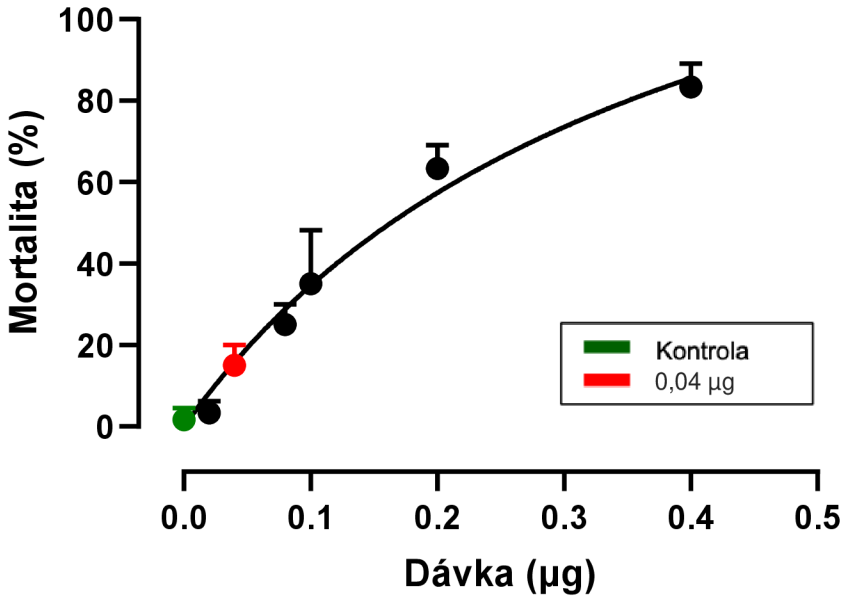
3.9 Statistické zpracování výsledků

Ke zpracování výsledků byly použity programy GraphPad Prism 8 a Microsoft Excel 2019. V programu GraphPad Prism 8 byly pomocí standardních křivek přepočteny naměřené hodnoty. V tomto programu byly taktéž vytvořeny grafy a provedeno statistické vyhodnocení výsledků pomocí Studentova t-testu na 5% hladině významnosti. (viz kap. 4. Výsledky).

4 VÝSLEDKY

4.1 Mortalita včel v závislosti na dávce imidaclopridu

Nejdříve byla sledována mortalita včel v závislosti na dávce insekticidu po 24 hodinách po aplikaci. Následně byla zvolena vhodná dávka insekticidu, při která se mortalita včel pohybovala mezi 15-20 %. Hodnota této dávky byla 0,04 µg/včela. Z grafu (Obr. 1) lze vyčíst, že mortalita včel stoupala se zvyšující se dávkou imidaclopridu. U kontrolních skupin ošetřených acetonem byla mortalita téměř nulová (0,33 %). Nejnižší aplikovaná dávka 0,02 µg/včela měla velmi nízkou mortalitu (3,33 %). Dávka 0,4 µg/včela již dosahovala mortality přes 80 %.

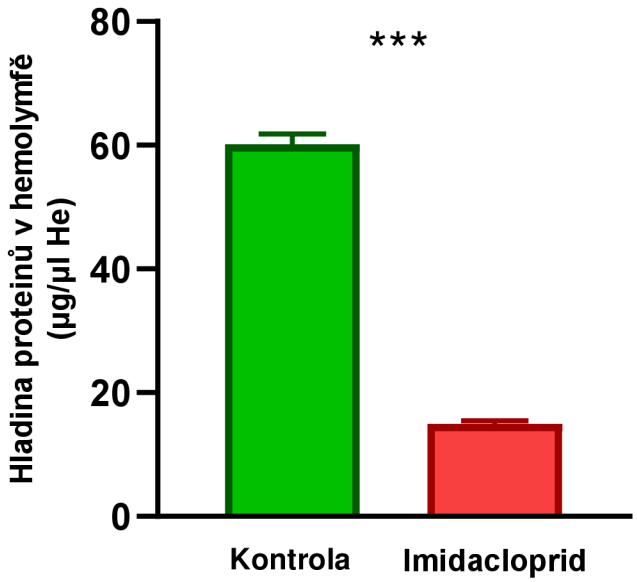


Obr. 1: Vliv aplikace imidaclopridu na mortalitu včely medonosné po 24 hodinách od aplikace. Body přestavují průměr z 5 skupin (v každé skupině bylo 20 jedinců) ± SD.

4.2 Vliv imidaclopridu na množství živin v hemolymfě

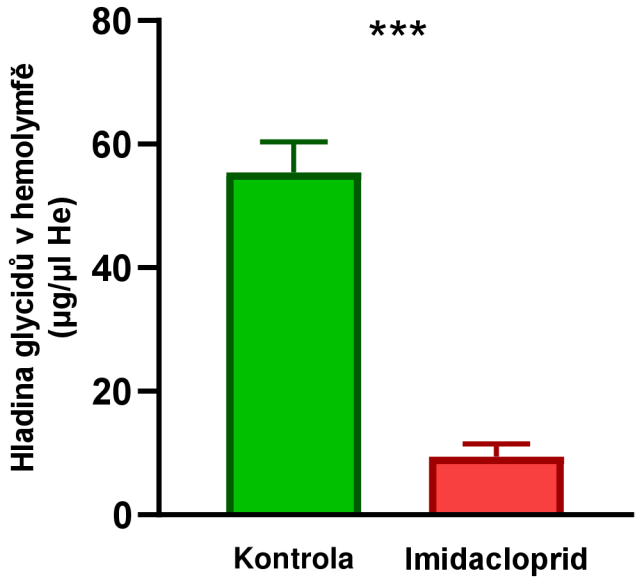
V důsledku působení různých stresorů na organismus může dojít ke kolísaní hladiny živin v hemolymfě. Proto bylo měřeno, jak aplikace imidaclopridu ovlivní hladinu proteinů, glycidů a lipidů v hemolymfě. Z následujícího grafu (Obr. 2) lze vyčíst, že hladina proteinů u skupiny ošetřené imidaclopridem oproti kontrolní skupině statisticky významně poklesla (4krát). Stejně tak tomu bylo i u hladiny glycidů v hemolymfě (Obr. 3), zde byl pokles 5,9násobný. Naopak u hladiny lipidů došlo u skupiny ošetřené imidaclopridem ke statisticky významnému zvýšení (Obr. 4) (1,5násobnému). Na grafech (Obr. 2, 3, 4) lze také vidět, že hladina lipidů je jak u kontrolní skupiny, tak u skupiny ošetřené imidaclopridem několikanásobně nižší než hladina proteinů či glycidů u těchto skupin.

4.2.1 Proteiny



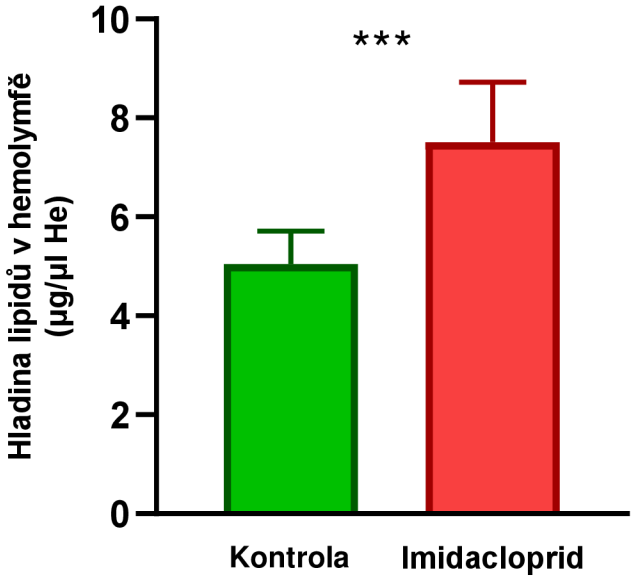
Obr. 2: Vliv aplikace imidaclopridu (0,04 µg) na hladinu proteinů v hemolymfě včely medonosné. Statisticky významné rozdíly mezi kontrolní skupinou a skupinou ošetřenou insekticidem (průměr ± SD, n=10) byly vypočteny pomocí nepárového t-testu (***$p < 0{,}0001$).

4.2.2 Glycidy



Obr. 3: Vliv aplikace imidaclopridu (0,04 µg) na hladinu glycidů v hemolymfě včely medonosné. Statisticky významné rozdíly mezi kontrolní skupinou a skupinou ošetřenou insekticidem (průměr ± SD, n=10) byly vypočteny pomocí nepárového t-testu (***p < 0,0001).

4.2.3 Lipidy

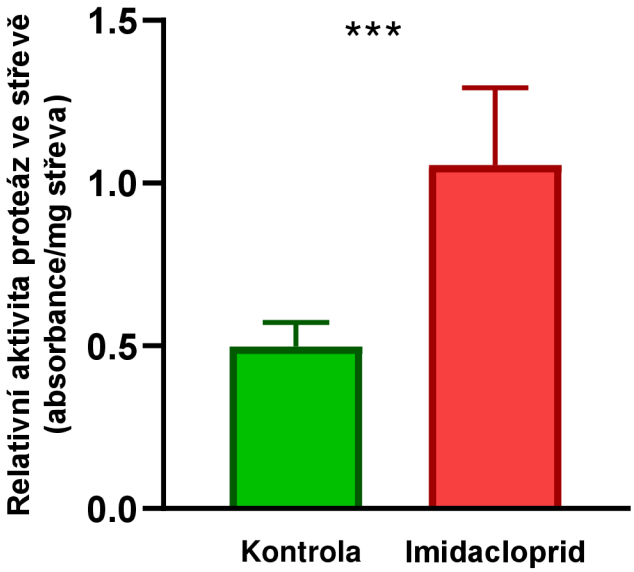


Obr. 4: Vliv aplikace imidaclopridu (0,04 µg) na hladinu lipidů v hemolymfě včely medonosné. Statisticky významné rozdíly mezi kontrolní skupinou a skupinou ošetřenou insekticidem (průměr ± SD, n=10) byly vypočteny pomocí nepárového t-testu (***p < 0,0001).

4.3 Vliv imidaclopridu na aktivitu trávicích enzymů ve střevě

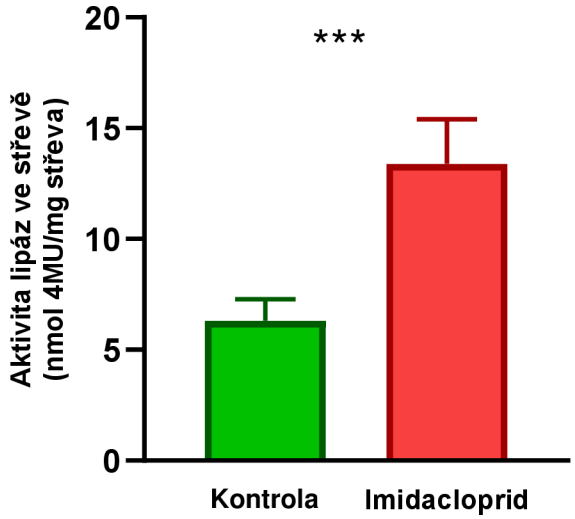
Dále byla měřena aktivita trávicích enzymů ve střevě včely. Na Obr. 5 lze vidět, že aplikace imidaclopridu zvýšila statisticky významně aktivitu proteáz ve střevě oproti kontrolní skupině asi 2krát. Stejně tak se zvýšila i aktivita lipáz (Obr. 6) - asi 2,1krát. U amylázové aktivity (Obr. 7) nebyl mezi skupinami naměřen prokazatelný rozdíl.

4.3.1 Proteázy



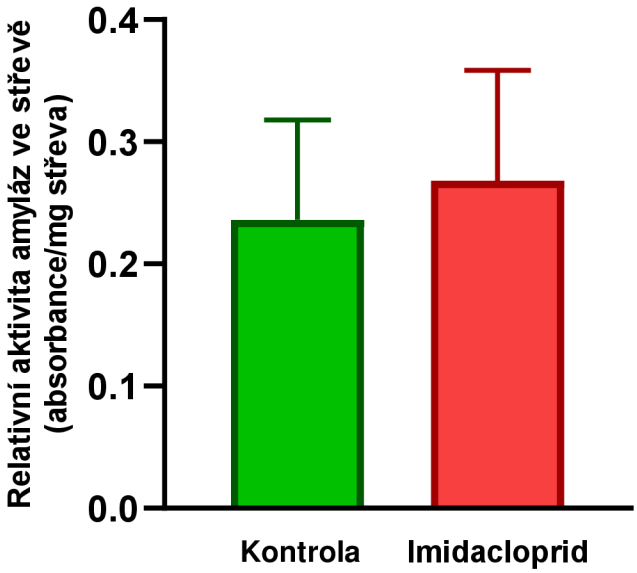
Obr. 5 Vliv aplikace imidaclopridu (0,04 µg) na aktivitu proteáz ve střevě včely medonosné. Statisticky významné rozdíly mezi kontrolní skupinou a skupinou ošetřenou insekticidem (průměr ± SD, n=8) byly vypočteny pomocí nepárového t-testu (***p < 0,0001).

4.3.2 Lipázy



Obr. 6 Vliv aplikace imidaclopridu (0,04 µg) na aktivitu lipáz ve střevě včely medonosné. Statisticky významné rozdíly mezi kontrolní skupinou a skupinou ošetřenou insekticidem (průměr ± SD, n=8) byly vypočteny pomocí nepárového t-testu (***p < 0,0001).

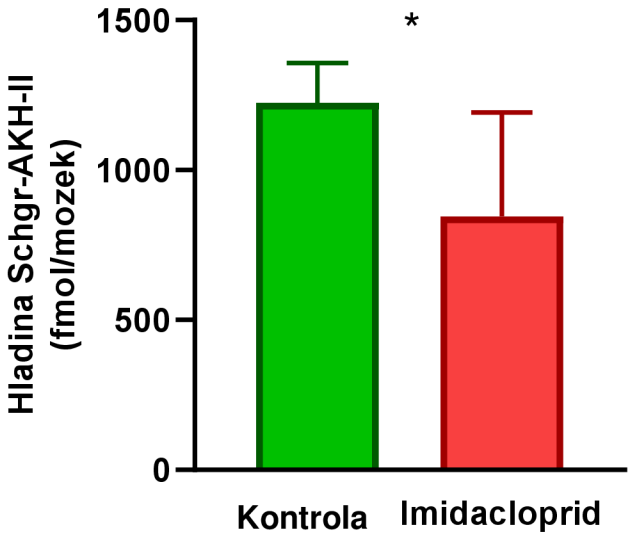
4.3.3 Amylázy



Obr. 7: Vliv aplikace imidaclopridu (0,04 µg) na aktivitu amyláz ve střevě včely medonosné. Mezi hodnotami (průměr ± SD, n=10) nebyl zjištěn statistický rozdíl pomocí nepárového t-testu (p > 0,05).

4.4 Vliv imidaclopridu na hladinu AKH v CNS

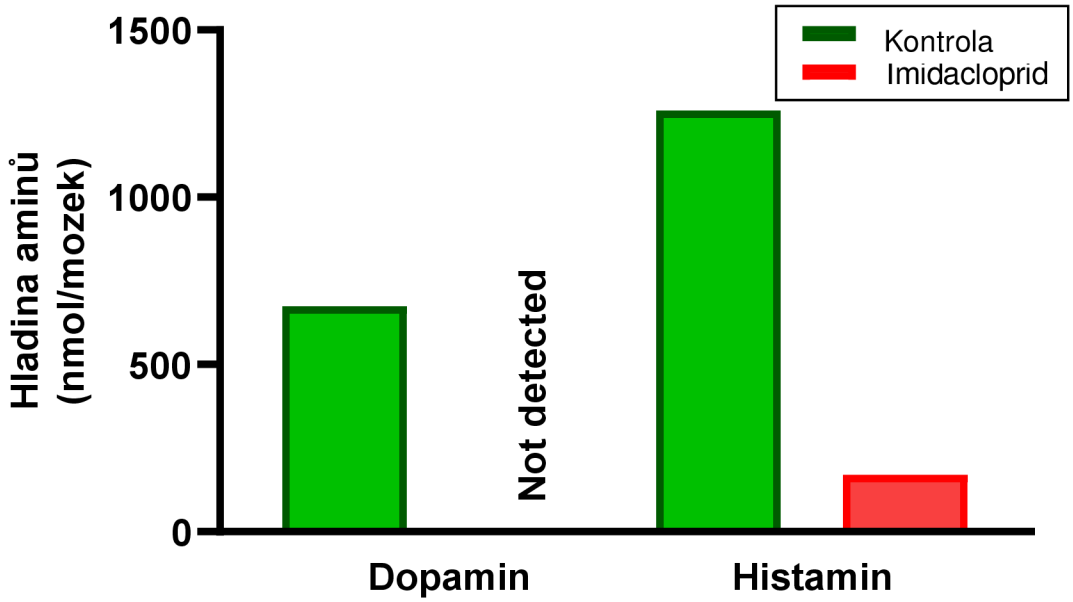
Dále byla měřena hladina adipokinetického hormonu v centrální nervové soustavě včely. AKH je hmyzí antistresový hormon, a proto se předpokládalo, že jeho hladina bude pod vlivem imidaclopridu kolísat. Z grafu (Obr. 8) lze vyčíst, že hladina AKH po aplikaci imidaclopridu (0,04 µg/včela) statisticky významně klesla (1,4krát).



Obr. 8: Vliv aplikace imidaclopridu (0,04 µg) na hladinu AKH v centrální nervové soustavě včely medonosné. Statisticky významné rozdíly mezi kontrolní skupinou a skupinou ošetřenou insekticidem (průměr ± SD, n=8) byly vypočteny pomocí nepárového t-testu (***p < 0,0001).

4.5 Vliv imidaclopridu na množství aminů v CNS

V poslední řadě byla v rámci této bakalářské práce měřena hladina biogenních aminů v centrální nervové soustavě, jelikož se biogenní aminy v hmyzím těle mimo jiné účastní i antistresových reakcí. Ve spolupráci s Katedrou biochemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci byl proveden pilotní pokus měření hladiny histaminu a dopaminu v centrální nervové soustavě včel. Z následujícího grafu (Obr. 9) lze vyčíst, že imidacloprid jasně snižuje hladinu aminů v centrální nervové soustavě. Hladina histaminu u včel ošetřených imidaclopridem se oproti kontrole značně snížila (asi 6,5krát), hladina dopaminu byla nulová.



Obr. 9: Vliv aplikace imidaclopridu (0,04 µg) na hladinu aminů v centrální nervové soustavě včely medonosné.

5 DISKUZE

K vyvolání obranných fyziologických reakcí včely medonosné *A. mellifera* L. byl použit neonikotinoidní insekticid imidacloprid. Během několika posledních let média často informovala o úhynech včelstev medonosných ve Spojených státech, Evropě a Japonsku (Ratnieks a Carreck, 2010, Neumann a Carreck, 2010). Jedním ze stresorů způsobujících úhyny včelstev jsou právě insekticidy. Včela medonosná je pro člověka důležitá z ekonomického i ekologického hlediska. Jako opylující hmyz hraje zásadní roli při pěstování zemědělských plodin. Právě při opylování se často setkává s insekticidy jako je imidacloprid. Bylo proto zajímavé studovat, jaké dopady má imidacloprid na včelí organismus.

Imidacloprid byl včelám aplikován topikálně na svrchní stranu zadečku. Tento způsob aplikace byl poměrně neinvazivní a zároveň tak bylo docíleno toho, že včelám byla aplikována přesná dávka insekticidu. V některých studiích byly insekticidy včelám přidávány do krmiva (Raymann a kol., 2018, Meikle a kol., 2016), tak aby byly co nejlépe simulovány podmínky, v jakých se s neonikotinoidními insekticidy včela ve volné přírodě setkává. Nicméně, u této metody je poměrně složité zjistit, jakou dávku insekticidu včela pozřela. Proto jsme v rámci mé bakalářské práce tuto metodu nezvolili. Dalším možným způsobem aplikace bylo ošetření včel imidaclopridem injekčně. Jelikož se ale imidacloprid skrz kutikulu absorbuje velice dobře, nebylo nutné volit tuto poměrně invazivní metodu a včelám tak způsobovat další stres.

Sestavená křivka mortality ukázala, že se zvyšující se dávkou imidaclopridu stoupá i mortalita včel. Pomocí této křivky byla vybrána vhodná dávka insekticidu pro následující pokusy. Jak se ukázalo již předchozích výzkumech (Bodláková 2020, Kainzová, 2021) vhodná dávka by měla mít mortalitu kolem 20–25 %. Při této mortalitě je vliv insekticidu průkazný a zároveň přežívá dostatek jedinců k analýze. Tato dávka představovala 0,04 µg imidaclopridu na včelu.

Důkazem o vyvolaném stresu v těle je mimo jiné i kolísaná hladiny živin v hemolymfě. V mé práci došlo ke znatelnému snížení hladiny glycidů, a to 4krát. Stejně tak tomu bylo i u hladiny proteinů, kde došlo k 5,9násobnému snížení. Jako možné vysvětlení se nabízí, že dané živiny byly spotřebovány na antistresovou reakci. Co se týče hladiny lipidů, byl zaznamenán lehký nárůst. Tento jev není jednoduché vysvětlit. Podstatné však je, že hladina lipidů v hemolymfě je u včely několikanásobně nižší (asi 10krát) než hladina glycidů nebo proteinů. V celkovém

množství živin v hemolymfě je tak zvýšení hladiny lipidů nepatrné. Zajímavé je srovnání s prací Bodláková a kol. (2022), kde byl jako modelový organismus použit šváb *Periplaneta americana*, jelikož šváb stejně jako včela využívá primárně metabolismus glycidů. Podobně jako v mé práci zde došlo po ošetření švábů včelím jedem k výraznému snížení hladiny glycidů a nepatrnému nárůstu hladiny lipidů v hemolymfě. Je tedy možné, že u švába i včely slouží glycidy jako hlavní zdroj energie pro obranné reakce. Měření hladiny živin v hemolymfě bylo také prováděno v rámci práce Kainzová (2021), kde byl k ošetření včel použit včelí jed. Z výsledků této práce ale naopak vyplývá, že hladina glycidů a lipidů v hemolymfě stoupá, naopak hladina proteinů znatelně klesá. Je tedy vidět, že různé stresory mohou v tomtéž organismu vyvolávat rozdílné antistresové reakce.

Při akutní antistresové odpovědi organismus dochází také k inhibici trávicích enzymů a k zastavení příjmu potravy. Bylo prokázáno, že tento proces je ovlivňován mimo jiné i adipokinetickými hormony. Touto problematikou se zabývali Kodrík a kol. (2012) a Vinokurov a kol. (2014) u ploštice *Pyrrhocoris apterus* nebo také Bodláková a kol. (2018) u švába *P. americana*. V mé práci došlo po aplikaci imidaclopridu naopak ke zvýšení aktivity některých trávicích enzymů ve střevě (proteáz, lipáz). Jelikož střevo bylo analyzováno po 24 hodinách od aplikaci imidaclopridu, akutní antistresová odpověď již neprobíhá. Je tedy možné, že zde dochází k doplňování energetických zdrojů spotřebovaných při obranné reakci. Ke zvýšení aktivity trávicích enzymů došlo i po aplikaci včelího jedu do těla včely – měření probíhalo také po 24 hodinách od aplikace jedu (Kainzová, 2021).

Jak bylo výše zmíněno, adipokinetické hormony se podílejí na antistresové odpovědi organismu a ovlivňují celou řadu fyziologických reakcí. Bylo zjištěno, že hladina AKH v CNS kolísá v závislosti na typu a délce působení stresoru. Například u ploštice *P. apterus,* došlo po ošetření insekticidy k navýšení hladiny AKH (Kodrík a Socha, 2005). Stejně tak tomu bylo i u švába *P. americana*, kdy po použití přírodního stresoru ve formě včelího jedu došlo ke zvýšení hladiny AKH až 3,8krát (Bodláková a kol., 2022). Můžeme ale najít i případy, kdy došlo k poklesu této hladiny. V práci Kainzová (2021) bylo zjištěno, že po aplikace včelího jedu do těla včely medonosné dochází ke snížení hladiny AKH v CNS, a to až 5násobně. Předpokládalo se, že stres vyvolaný imidaclopridem způsobí kolísání hladiny AKH v mozku, stejně tak, jako tomu je i u jiných stresorů. Mé měření ukázaly, že po aplikaci imidaclopridu došlo ke snížení hladiny AKH

v CNS téměř o třetinu. To si lze vysvětlit tím, že AKH již bylo spotřebováno na obrannou reakci, a tudíž se jeho hladina v centrální nervové soustavě snížila.

V rámci mé bakalářské práce byl proveden pilotní pokus měření hladiny aminů (histamin, dopamin) v CNS. Biogenní aminy, mimo jiné, vyvolávají fyziologické reakce na různé faktory prostředí, včetně stresových podmínek nebo infekce patogeny (Gruntenko a kol., 2016). Z dosavadních výsledků se zdá, že imidacloprid hladinu aminů dramaticky snižuje až k nulovým hodnotám. Ve výzkumu se bude dále pokračovat v rámci mé diplomové práce.

6 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo sledování fyziologických procesů probíhajících v těle včely medonosné *A. mellifera* po aplikaci imidaclopridu (neonikotinoidní insekticid). Bylo zjištěno následující:

1. Hladina živin v hemolymfě se po aplikaci imidaclopridu signifikantně mění. Hladina glycidů a proteinů klesá, naopak hladina lipidů stoupá.

2. Aktivita střevních proteáz a lipáz se po aplikace imidaclopridu zvyšuje. Aktivita střevních amyláz se signifikantně nemění.

3. Hladina adipokinetického hormonu centrální nervové soustavě měřená pomocí ELISA testu se po aplikaci imidaclopridu snižuje.

4. Hladina aminů v centrální nervové soustavě po aplikaci imidaclopridu klesá k téměř nulovým hodnotám.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Adamo, S.A. (2012). *The effects of the stress response on immune function in invertebrates: An evolutionary perspective on an ancient connection.* Horm. Behav. 62, 324–330.

2. Bernfeld, P. (1955). *Amylases, α and β.* In: Colowick, S. P., Kaplan, N. O. (Eds.). Academic Press, New York. Methods in Enzymology 1, 149–158.

3. Bodláková, K. (2020). *Hormonálně řízená obrana proti hmyzím patogenům.* Bakalářská práce (Bc.). Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. Přírodovědecká fakulta.

4. Bodláková, K., Beňová, M., Kodrík, D. (2018). *The effect of adipokinetic hormones on the activity of digestive enzymes.* Physiological Entomology 43, 140–148.

5. Bodláková, K., Černý, J., Štěrbová, H., Guráň, R., Zítka, O., Kodrík, D. (2022). *Insect Body Defence Reactions against Bee Venom: Do Adipokinetic Hormones Play a Role?* Toxins 14, 11.

6. Carol, N.V., Longley, R.W., Roe, J.H. (1956). *The determination of glycogen in liver and muscles by use of anthrone reagent.* The Journal of Biological Chemistry 220, 583-593.

7. Chrousos, G.P. (2009). *Stress and disorders of the stress system*. Nat. Rev. Endocrinol. 5, 374–381.

8. Cresswell, J.E. (2011). *A meta-analysis of experiments testing the effects of a neonicotinoid insecticide (imidacloprid) on honey bees.* Ecotoxicology 20, 149–157.

9. Elbert, A., Haas, M., Springer, B., Thielert, W., Nauen, R. (2008). *Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection.* Pest Manag. Sci. 64, 1099–1105.

10. Farooqui, T. (2012). *Review of octopamine in insect nervous systems.* Open Access Insect Physiol. 4, 1–17.

11. Fink, G. (2009). *Stress: Definition and History. In Encyclopedia of Neuroscienc*. Elsevier 549–555. ISBN 9780080450469.

12. Gäde, G. (1990). *The Adipokinetic hormone/Red pigment concentrating hormone peptide family: Structures, interrelationships and fiction*. J.Insect Physiol. 36, 1–12.

13. Gäde, G., Auerswald, L. (2003). *Mode of action of neuropeptides from the adipokinetic hormone family.* Gen. Comp. Endocr. 132, 10–20.

14. Gäde, G., Goldsworthy, G.J., Schaffer, M.H., Cook, J.C., Rinehart, K. (1986). *Sequence analyses of adipokinetic hormones-II from corpora cardiaca of Schistocerca nitans, Schistocerca gregaria, and Locusta-migratoria by fast-atom-bombardment mass-spectrometry.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 134, 723–730.

15. Gäde, G., Hoffmann, K.H., Spring, J.H. (1997). *Hormonal regulation in insects: facts, gaps, and future directions.* Physiol. Rev. 77, 963–1032.

16. Gruntenko, N.E., Adonyeva, N.V., Burdina, E.V., Karpova, E.K., Andreenkova, O.V., Gladkikh, D.V., a kol. (2016). *The impact of FOXO on dopamine and octopamine metabolism in Drosophila under normal and heat stress conditions.* Biol. Open 5, 1706–1711.

17. Gupta, G.C., Miller Mukherjee, I.R., Malik, J.K., Doss, R.B., Dettbarn, W., Milatovic, D. (2019). *Biomarkers in Toxicology (Second Edition).* Academic press 455–475.

18. Jeschke, P., Nauen, R., Schindler, M., Elbert, A. (2011). *Overview of the status and global strategy for neonicotinoids*. J. Agric. Food Chem. 59, 2897–2908.

19. Kainzová, K. (2021). *Vliv přírodních toxinů na včelu medonosnou.* Bakalářská práce (Bc.). Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. Přírodovědecká fakulta.

20. Kodrík, D. (2008). *Adipokinetic hormone functions that are not associated with insect flight*. Physiol. Entomol. 33, 171-180.

21. Kodrík, D., Bednářová, A., Zemanová, M., Krishnan, N. (2015). *Hormonal Regulation of Response to Oxidative Stress in Insects—An Update.* Int. J. Mol. Sci. 16, 25788–25816.

22. Kodrík, D., Socha, R. (2005). *The effect of insecticide on adipokinetic hormone titre in the insect body.* Pest Management Science 61, 1077–1082.

23. 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 Biochemistry and Molecular Biology 30, 489-498.

24. Kodrík, D., Vinokurov, K., Tomčala, A., Socha, R. (2012). *The effect of adipokinetic hormone on midgut characteristics in Pyrrhocoris apterus L. (Heteroptera).* Journal of Insect Physiology 58, 194–204.

25. Kollisch, G.V., Lorenz, M.W., Kellner, R., Verhaert, P.D. and Hoffmann, K.H. (2000). *Structure elucidation and biological activity of an unusual adipokinetic hormone from corpora cardiaca of the butterfly, Vanessa cardui.* Europ. J. Biochem. 267, 5502-5508.

26. Krieger, R.I. (2010). *Hayes' handbook of pesticide toxikology (Third edition*). Boston: Elsevier/AP. ISBN 978-0-12-374367-1.

27. Marchal, E., Schellens, S., Monjon, E., Bruyninckx, E., Marco, H.G., Gäde, G., Broeck, J. Vanden, Verlinden, H. (2018). *Analysis of peptide ligand specificity of different insect adipokinetic hormone receptors.* Int. J. Mol. Sci. 19, 542.

28. Meikle, W.G., Adamczyk, J.J., Weiss, M., Gregorc, A., Johnson, D.R., Stewart, S.D., Zawislak, J., Carroll, M.J., Lorenz, G.M. (2016). *Sublethal Effects of Imidacloprid on Honey Bee Colony Growth and Activity at Three Sites in the U.S.* PloS one 11(12), e0168603.

29. Möstl, E., Palme, R. (2002). *Hormones as indicators of stress.* Domestic Animal Endocrinology 23, 67–74.

30. Neumann, P., Carreck, N. (2010). *Honey bee colony losse*s. J. Apic. Res. 49, 1-6.

31. Oerke, E.C., Dehne, H.W. (2004). *Safeguarding production—losses in major crops and the role of crop protection.* Crop Prot. 23, 275–285.

32. Přidal, A. (1996). *Morfologie, anatomie, fyziologie, pitva a preparace včely medonosné (Apis mellifera, L.).* Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita.

33. Ratnieks, F.L.W., Carreck, N.L. (2010). *Clarity on Honey Bee Collapps?* Science 327, 152–153.

34. Raymann K., Motta E.V.S., Girard C., Riddington I.M., Dinser J.A., Moran N.A. (2018). *Imidacloprid decreases honey bee survival rates but does not affect the gut microbiome.* Appl. Environ. Microbiol. 84(13), e00545–18.

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

36. Seifert, J., Stollberg, J. (2005). *Antagonism of a neonicotinoid insecticide imidacloprid at neuromuscular receptors.* Environ. Toxicol. Pharmacol. 20, 18–21.

37. Sely, H. (1936). *A syndrome produced by diverse nocuous agents*. Nature 138, 32.

38. Sheets, L.P. (2010). *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology (Third Edition)*. Boston: Elsevier/AP. ISBN 978-0-12-374367-1.

39. Stoscheck, C. M. (1990). *Quantitation of proteins*. Academic Press, Inc. In: Methods in Enzymology 182, 50-68.

40. Veselý, V. a kol. (2003). *Včelařství*. Brázda. ISBN 80–209-0320-8.

41. 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.* Journal of Insect Physiology 60, 58–67.

42. Yaribeygi, H., Panahi, Y., Sahraei, H., Johnston, T. P., Sahebkar, A. (2017). *The impact of stress on body function: A review.* EXCLI Journal 16, 1057.

43. Zöllner, N., Kirch, K. (1962). *Über die quantitave Bestimmung von Lipoiden (Mikromethode) mittels der vielen naturlichen Lipoiden (allen bekammten Plasmolipoiden) gemeinsamen Sulfo – phosphovanillin Reaktion.* Zeitschrift fur die Gesamte Experimentalle Medizin 135, 545–561.