

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Metody měření parametrů oxidačního stresu u hmyzu

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Eliška Pindřáková
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Jiří Danihlák, Ph.D.
Rok:	2021

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne 26.4.2021

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala vedoucímu mé diplomové práce panu Mgr. Jiřímu Danihlíkovi, Ph.D., za odborné vedení, cenné rady, připomínky a čas, které mi věnoval při zpracování této práce. Dále děkuji Mgr. Silvii Dostálkové za cenné rady při práci v laboratoři a všem členům Katedry biochemie za přátelský přístup. Dále patří velké poděkování mé rodině za jejich podporu při mém studiu a vypracování této práce.

Děkuji také za podporu poskytnutou grantem MŠMT LTAUSA17_116 Úloha reaktivních forem dusíku a kyslíku v signálních drahách a odpovědích včel na stresové podmínky.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Eliška Pindřáková
Název práce	Metody měření parametrů oxidačního stresu u hmyzu
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Jiří Danihlák, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2021

Abstrakt

Reaktivní kyslíkové radikály neboli ROS jsou velmi reaktivní molekuly kyslíku s oxidačními vlastnostmi. Tyto molekuly vznikají během metabolismu v buňce, nebo pochází z exogenních zdrojů (ionizující záření, pesticidy, toxické látky). Množství ROS v buňce je regulováno antioxidačním systémem, jehož součástí je řada antioxidačních enzymů a látek. V nízké koncentraci hrají důležitou roli ve fyziologických procesech jako je signalizace či fagocytóza. K produkci ROS také dochází v rámci humorální imunitní reakce, jakožto reakce proti vnějším i vnitřním biologickým vlivům. Avšak ve vysoké koncentraci jsou ROS cytotoxické a poškozují řadu biologicky důležitých molekul. Jejich působením dochází například k peroxidaci lipidů, karboxylaci proteinů či oxidaci DNA; čímž tyto molekuly ztrácí svou funkci. Ke stanovení oxidačního stresu se využívá měření koncentrace koncových produktů oxidačního poškození.

V experimentální části byly optimalizovány metody pro stanovení lipidické peroxidace (LPX). Metodou FOX2 byla stanovena koncentrace lipidových hydroperoxidů (LOOH). Byla optimalizována příprava vzorků s výslednou spektrofotometrickou detekcí a kvantifikací těchto látek na mikrodestičkovém readru. Byla ověřena správnost a opakovatelnost tohoto stanovení, a to jak u standardů pro LOOH, tak i u vzorků včel. Další optimalizovanou metodou byla metoda TBARS, kterou se stanovuje koncentrace jednoho z koncových produktů LPX – malondialdehydu (MDA). Bylo optimalizováno fluorescenční stanovení na mikrodestičkovém readru, které mělo vyšší citlivost, nežli UV-VIS stanovení MDA. Pro metodu TBARS byla optimalizována také HPLC separace, detekce a kvantifikace produktu MDA. Tyto tři způsoby stanovení byly srovnány, pro rutinní laboratorní analýzu se nejlépe hodí fluorescenční stanovení pomocí mikrodestičkového readru. Stanovení na mikrodestičkovém readru je ve srovnání s HPLC stanovením rychlejší a levnější.

Po optimalizaci byly tyto metody využity ke stanovení lipidické peroxidace u včel, u nichž byl indukován oxidační stres, a to jak chemicky – paraquatem; tak vysokým napadením parazitem *Varroa destructor*. Metodou FOX2 byl u vzorků ošetřených paraquatem pozorován nárůst koncentrace LOOH se zvyšující se mírou stresu. Avšak u *Varroa* napadených včel koncentrace LOOH se zvyšující se mírou stresu klesala. Fluorescenčním stanovením metody TBARS byly stanoveny koncentrace MDA ve stejných vzorcích včel. U *Varroa* včel byla koncentrace MDA nižší, nežli u kontrolních

(zdravých) včel, čímž se potvrdil trend stanovený FOX2 metodou. Koncentrace MDA byla u včel ošetřených paraquatem velmi nízká a trend zde nebyl prokázán.

Klíčová slova	Včela medonosná, reaktivní formy kyslíku, oxidační stres, oxidační poškození, lipidická peroxidace, metoda TBARS, metoda FOX2, HPLC
Počet stran	84
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Eliška Pindáková
Title	Methods of measurement of oxidative stress in insects
Type of thesis	Master
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Jiří Danihlák, Ph.D.
The year of presentation	2021

Abstract

Reactive oxygen species or ROS are highly reactive oxygen molecules with oxidizing properties. These molecules are formed during metabolism in the cell or come from exogenous sources (ionizing radiation, pesticides, toxic substances). The amount of ROS in a cell is regulated by an antioxidant system, which includes a number of antioxidant enzymes and substances. At low concentrations, they play an important role in physiological processes such as cell signaling or phagocytosis. ROS production also occurs as part of a humoral immune response, as a response against both external and internal biological influences. However, at high concentrations, ROS are cytotoxic and damage a number of biologically important molecules. For example, their action leads to lipid peroxidation, protein carbonylation or DNA oxidation; whereby these molecules lose their function. Measurement of the concentration of oxidative damage terminal products is used to determine oxidative stress.

In the experimental part, methods for the determination of lipid peroxidation (LPX) were optimized. The concentration of lipid hydroperoxides (LOOH) was determined by the FOX2 method. The preparation of samples was optimized with the optimized spectrophotometric detection and quantification of these substances on a microplate reader. The accuracy and repeatability of this determination were verified, both for LOOH standards and for bee samples. Another optimized method was the TBARS method, which determines the concentration of one of the terminal products of LPX - malondialdehyde (MDA). The fluorescence assay on a microplate reader was optimized, it had a higher sensitivity than the UV-VIS assay. HPLC separation, detection and quantification of the MDA product were also optimized for the TBARS method. All the three assay methods were compared, with fluorescence assays using a microplate reader being best suited for routine laboratory analysis. The microplate reader assay is faster and cheaper than the HPLC assay.

Optimized methods were used to determine lipid peroxidation in bees in which oxidative stress was induced, both chemically - by paraquat and by high infestation by the parasite *Varroa destructor*. An increase in LOOH levels with increasing stress was observed in paraquat-treated samples using the FOX2 method. However, in *Varroa*-infested bees, LOOH levels decreased with increasing stress. MDA concentrations in the same bee samples were determined by TBARS fluorescence assay. In *Varroa* bees, the MDA concentration was lower than in control (healthy) bees, thus confirming the

trend determined by the FOX2 method. MDA levels were very low in paraquat-treated bees and the trend was not demonstrated.

Keywords	Honey bee, reactive oxygen species, oxidative stress, oxidative damage, lipid oxidation, TBARS method, FOX2 method, HPLC
Number of pages	84
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1	ÚVOD.....	12
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	13
2.1	Reaktivní kyslíkové radikály	13
2.1.1	Vznik ROS.....	14
2.1.2	Obrana proti ROS	16
2.2	Fyziologické účinky ROS.....	19
2.3	Škodlivé vlivy ROS	21
2.3.1	Lipidická peroxidace (LPX).....	22
2.3.2	Karbonylace proteinů (PCO).....	24
2.3.3	Oxidační poškození DNA.....	26
2.4	Propojení drah oxidačního stresu a imunity	29
2.4.1	Fyzikální bariéry.....	30
2.4.2	Buněčná imunita.....	30
2.4.3	Humorální imunita.....	31
2.4.3.1	Lysozym.....	31
2.4.3.2	Lektiny	31
2.4.3.3	Fenoloxidasa	31
2.4.3.4	Antimikrobiální peptidy (AmP).....	32
2.4.4	Sociální imunita.....	33
2.5	Metody stanovení oxidačního poškození	34
2.5.1	Metody stanovení lipidické peroxidace.....	34
2.5.2	Metody stanovení poškození proteinů.....	35
2.5.3	Metody stanovení poškození nukleových kyselin.....	36
2.6	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)	36
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	39
3.1	Materiál.....	39
3.1.1	Biologický materiál	39
3.1.1.1	Indukce oxidačního stresu chemicky - paraquatem	39
3.1.1.2	Indukce oxidačního stresu vysokým napadením parazitem <i>Varroa destructor</i>	39
3.1.2	Chemikálie.....	40
3.1.3	Přístrojové vybavení.....	41
3.1.4	Činidla	41
3.1.4.1	FOX2 metoda	41
3.1.4.2	TBARS metoda	42
3.1.4.3	HPLC	42
3.1.4.4	Metoda pro stanovení LPX s použitím thiokyanatanu železitého.....	42
3.2	Metoda FOX2 pro stanovení lipidových peroxidů	43
3.2.1	Příprava vzorků pro FOX2 stanovení.....	43
3.2.2	Stanovení kalibrační rovnice pro FOX2 metodu.....	43
3.2.3	Obohacení vzorku o standard CuOOH.....	44
3.2.4	Spektrofotometrické měření koncentrace LPX metodou FOX2	44

3.3	Metoda TBARS pro stanovení malondialdehydu na readru Synergy H1	45
3.3.1	Příprava vzorků pro TBARS stanovení.....	45
3.3.2	Stanovení kalibrační rovnice pro TBARS.....	45
3.3.3	Obohacení vzorku o standard TEP a jeho zpětné stanovení ze vzorku	46
3.3.4	Spektrofotometrické stanovení lipidické peroxidace metodou TBARS	46
3.4	HPLC separace, detekce a kvantifikace TBARS produktu	47
3.4.1	Příprava vzorků	47
3.4.2	Kalibrační řada	47
3.4.3	HPLC analýza.....	47
3.5	Stanovení lipidových hydroperoxidů metodou s thiokyanatanem železitým.....	49
3.5.1	Příprava vzorků	49
3.5.2	Kalibrační řada	49
3.5.3	Stanovení lipidových hydroperoxidů ve vzorcích včel	50
3.6	Statistické vyhodnocení.....	50
4	VÝSLEDKY	51
4.1	Metoda FOX2	51
4.1.1	Vývoj metodiky	51
4.1.2	Kalibrační přímka.....	52
4.1.3	Zpětné stanovení standardu kumenhydroperoxidu (CuOOH).....	53
4.1.4	Měření vzorků včel.....	54
4.1.4.1	Měření vzorků <i>Varroa</i> včel.....	54
4.1.4.2	Měření vzorků včel ošetřených paraquatem	55
4.2	Metoda TBARS	56
4.2.1	Optimalizace stanovení na spektrofotometru	56
4.2.2	Kalibrační přímka pro metodu TBARS.....	57
4.2.3	Zpětné stanovení standardu tetraethoxypropanu (TEP)	58
4.2.4	Měření vzorků včel.....	60
4.2.4.1	Měření vzorků <i>Varroa</i> včel.....	60
4.2.4.2	Měření vzorků včel ošetřených paraquatem	61
4.3	HPLC separace, detekce a kvantifikace produktu reakce TBARS.....	62
4.3.1	Optimalizace.....	62
4.3.2	Kalibrační přímka.....	64
4.3.3	Zpětné stanovení standardu TEP	66
4.3.4	Měření vzorků testovacích včel k ověření metody.....	67
4.4	Srovnání UV-VIS stanovení a fluorescenčního stanovení na mikrodestičkovém readru s fluorescenčním stanovení pomocí HPLC systému	68
4.4.1	Kalibrační přímky pro porovnání metod stanovení produktů TBARS na spektrofotometru a po HPLC separaci.....	68
4.4.2	Měření vzorků cvičných včel	69
4.5	Stanovení hladiny lipidových hydroperoxidů pomocí thiokyanatanu železitého	70
5	DISKUZE	72

6	ZÁVĚR	77
7	LITERATURA.....	79
8	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	83

Cíle práce

Vypracování literární rešerše o fyziologických a patologických funkcích ROS u hmyzu se zaměřením na včely.

Zpracování poznatků z literatury o oxidačním poškození biomolekul.

Zpracování literární rešerše o metodách používaných pro stanovování parametrů oxidačního stresu.

Optimalizace měření lipidické peroxidace zahrnující hydroperoxydy metodou FOX2 a malondialdehydu metodou TBARS.

Zavedení HPLC separace, detekce a kvantifikace produktů reakce metody TBARS.

1 ÚVOD

Zdraví včel je velmi diskutovaným tématem, jelikož je včela medonosná jedním z nejvýznamnějších zástupců společenského hmyzu a je také důležitým opytovatelem. Studium zdraví včel může vést k aplikaci poznatků do praxe. Se zdravím včel je často spojován oxidační stres, který nastává v případě hromadění reaktivních kyslíkových radikálů (ROS) v organismu.

Mnoho kyslíkových radikálů vzniká v buňkách během jejich metabolismu, či unikají z mitochondriálního řetězce. ROS mohou pocházet také z exogenních zdrojů, například působením ionizujícího záření, nebo toxinů z životního prostředí. Oxidační stres je pak stav, kdy není ustanovena rovnováha mezi tvorbou reaktivních forem kyslíku a jejich neutralizací za pomoci antioxidačního systému. Převaha jednoho či druhého procesu vede k poškození organismu. V případě převahy tvorby ROS vzniká právě oxidační stres, který působí na biologicky významné molekuly. Dochází tak k jejich oxidaci a tím pádem poškození a ztrátě funkce biomakromolekul – lipidů, proteinů a nukleových kyselin. V případě příliš vysoké aktivity antioxidačního systému dojde k nadbytečnému odstranění ROS a může dojít ke špatné funkci jistých signalizačních procesů atd.

Jelikož mají reaktivní kyslíkové radikály krátký poločas života, tak je velmi obtížné je studovat. Proto se ke zkoumání oxidačního stresu používá buďto stanovení specifické aktivity antioxidačních enzymů, nebo také měření koncových produktů oxidačního poškození, tzv. markerů. Nejčastěji zkoumaným oxidačním poškozením je lipidická peroxidace, jejímž následkem vznikají lipidové hydroperoxy (LOOH). Ty lze stanovit a analyzovat, a tím pádem lze určit míru oxidačního stresu. Tyto lipidové hydroperoxy jsou v průběhu času rozkládány na aldehydy, ketony a další uhlovodíky. Nejčastěji využívaným markerem oxidačního poškození lipidů v biologických vzorcích je malondialdehyd, což je konečný produkt lipidické peroxidace. Ten může být stanoven metodou s použitím kyseliny thiobarbiturové. Vznikající produkt může být analyzován různými způsoby – může být měřena absorbance ve viditelné oblasti spektra (VIS), či může být detekována fluorescence tohoto produktu.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Reaktivní kyslíkové radikály

Reaktivní kyslíkové radikály neboli ROS, jsou molekuly kyslíku, které se chovají jako silné oxidanty (Baltacioglu *et al.*, 2008). V biologických systémech existuje velké množství těchto molekul. Patří mezi ně například radikály jako je superoxidový ($\cdot\text{O}^{2-}$), hydroxylový ($\text{OH}\cdot$), či hydroperoxidový ($\text{ROO}\cdot$), dále například singletový kyslík ($^1\text{O}_2$) a neradikálové deriváty kyslíku, jako je peroxid vodíku (H_2O_2) (Miwa a Beckman, 2008). Celý výčet je uveden v tabulce (Tab. 1). Malé, fyziologické množství ROS je v buňkách potřeba, jsou totiž zapojeny v signálních drahách a regulují různé buněčné aktivity, například sekreci cytokinů, diferenciaci růstu a genovou expresi (Dalle-Donne *et al.*, 2006). Důležitou roli hrají ROS při obraně proti patogenům. Tyto molekuly mají potenciál k indukci biologického poškození biomolekul, jako je peroxidace lipidů, karbonylace proteinů či oxidace DNA (Baltacioglu *et al.*, 2008).

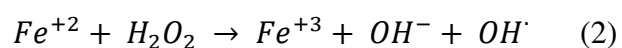
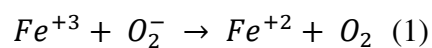
Tab. 1 Seznam vybraných reaktivních forem kyslíku (ROS) a jejich značky.

<u>Název</u>	<u>Značka</u>
superoxidový anionradikál	$\cdot\text{O}^{2-}$
peroxid vodíku	H_2O_2
hydroxylový radikál	$\text{HO}\cdot$
ozon	O_3
hydroxyperoxylový radikál	$\text{HO}_2\cdot$
peroxylový radikál	$\text{ROO}\cdot$
singletový kyslík	$^1\text{O}_2$

2.1.1 Vznik ROS

Reaktivní kyslíkové radikály jsou generovány různými reakcemi a pocházejí z různých zdrojů. Tyto zdroje můžeme rozdělit na endogenní a exogenní. Jakýkoliv elektrony přenášející protein či enzymatický systém může produkovat ROS, a to jako produkt vedlejší (Dalle-Donne, 2006). ROS mohou být v organismu produkovány na různých místech, například NADPH-oxidasa se nachází v plasmatické membráně, xanthinoxidasa produkuje ROS v cytoplasmě, a cytochrom P450 a další enzymy jsou lokalizovány v endoplazmatickém retikulu (Dalle-Donne, 2006). NADPH-oxidasa (NOX) je transmembránový enzym, který má několik isoform. NOX je jediným známým enzymem, jehož výhradní funkcí je produkce kyslíkových radikálů. Tento enzym katalyzuje jednoelektronovou redukci kyslíku, čímž vzniká superoxidový anionradikál (Tang *et al.*, 2014). Xanthinoxidasa je jedna z forem xanthinoxidoreduktasy. Tento enzym produkuje superoxidový anionradikál a peroxid vodíku, a to při oxidaci hypoxanthinu na xanthin (Tang *et al.*, 2014). Mezi další funkce xanthinoxidasy patří katabolismus xenobiotik v rámci detoxifikačního procesu (Cooper *et al.*, 2006). Cytochrom P450 monooxygenasy jsou hemoproteinové enzymy, které mají klíčovou roli v primárních i sekundárních metabolických drahách (Lamb a Waterman, 2013). Cytochrom P450 mimo jiné katalyzuje detoxikační reakce, při kterých je produkován superoxidový anionradikál. Peroxisomy jsou místem vysoké produkce peroxidu vodíku v buňce, obsahují totiž enzymy (oxidasy, peroxidasy atd.), které generují peroxid vodíku (Miwa a Beckman, 2008). Dalším z enzymů je například cyklooxygenasa (Fujii *et al.*, 2005).

Existují i neenzymatické endogenní zdroje, například největším producentem superoxidového radikálu je mitochondriální elektronový transportní řetězec. Tento systém přenáší elektrony během tvorby ATP, kdy tyto elektrony slouží k redukci kyslíku na vodu. Avšak část z nich opouští systém a způsobí produkci superoxidového anionradikálu. V mitochondriích následně mohou vznikat i další ROS. V matrix mitochondrii je enzym superoxidodismutasa, který při reakci se superoxidem generuje peroxid vodíku (Tang *et al.*, 2014). Superoxidový anionradikál může být produkován také během fagocytózy leukocytů, monocytů a makrofágů. Reakce Harber-Weiss (1) a Fentonova reakce (2) vedou k rozkladu peroxidu vodíku na hydroxylový radikál, a to v přítomnosti železnatých či měďnatých iontů (Kodrik *et al.*, 2015).



Existuje několik exogenních oxidantů, které působí na organismy a vedou k produkci ROS. Patří mezi ně ionizační záření, které za přítomnosti kyslíku dokáže přeměňovat hydroxylový, superoxidový a další organické radikály na peroxid vodíku a organoperoxidy. Vystavení buněk působení ozonu může vést k lipidické peroxidaci. Dalšími exogenními oxidanty jsou také ionty těžkých kovů, jako je železo, měď, rtuť atd. Tyto ionty pochází z polutantů z prostředí a indukují produkci ROS. Jejich působení vede k poškození buněk. Předpokládá se, že ROS jsou produkovány také po vystavení enviromentálním kontaminantům, jako jsou herbicidy a insekticidy (Kodrik *et al.*, 2015).

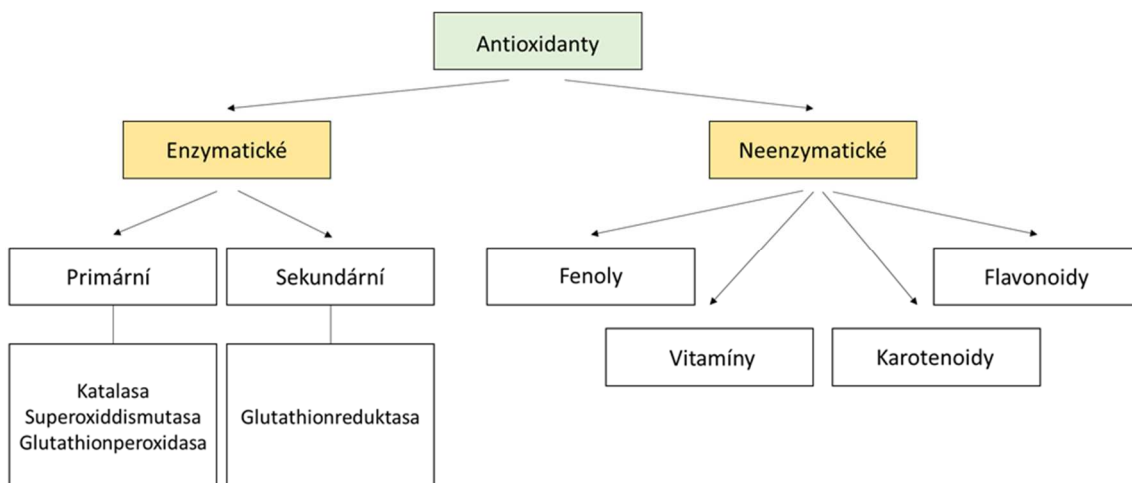
2.1.2 Obrana proti ROS

Rovnováha mezi produkcí a neutralizací ROS je velmi delikátní. Pokud se bilance přikloní k nadprodukcí ROS, u buňky se začnou projevovat známky oxidačního stresu. K obraně organismů slouží antioxidační systém (Carocho a Ferreira, 2013). Rozdělení antioxidantů je zobrazeno na (Obr. 1). Halliwell (2007) definoval antioxidanty jako jakoukoliv substanci, která oddaluje, předchází či odstraňuje oxidační poškození cílových molekul (Halliwell, 2007). Existují jisté mechanismy, které snižují působení reaktivních sloučenin kyslíku na organismus. Patří mezi ně mechanismy zabráňující tvorbě nových radikálů, dále také mechanismy vychytávající již vytvořené volné radikály (Štípek, 2000). Tyto molekuly se označují za tzv. scavengers (vychytávače), které daný radikál zachytí a přemění jej na neradikálovou formu, nebo tzv. quenchers (zhášeče), které molekulu zachytí a zahasí reaktivitu (Beneš, 2008). Posledním typem obranných mechanismů jsou takové, které se podílí na opravě poškozených biomolekul (Štípek, 2000). Patří sem například peptidasy či reparační endonukleasy (Beneš, 2008).

Dále mohou být antioxidační systémy rozděleny na enzymové a neenzymové. Je to řada sloučenin, které jsou nazývány antioxidanty (Santos *et al.*, 2018). Enzymové antioxidanty se dělí na primární (katalasa, superoxiddismutasa, glutathionperoxidasa atd.) a sekundární (glutathionreduktasa) (Carocho a Ferreira, 2013). Katalasa je antioxidační enzym vyskytující se ve většině organismech s aerobním metabolismem. Tento enzym zabráňuje vytvoření hydroxylového radikálu rozštěpením peroxidu vodíku na vodu a kyslík. Je známo mnoho katalasových sekvencí, které se řadí do jedné ze tří skupin, a to monofunkční katalasy, katalasy-peroxidasy a katalasy obsahující mangan (Chelikani *et al.*, 2004). Superoxiddismutasa je jedním z hlavních antioxidačních enzymů a jsou známy tři isoformy tohoto enzymu. Tento enzym dismutuje superoxidový anionradikál na peroxid vodíku (Fujii *et al.*, 2005). Glutathionperoxidasa 1 je hlavní isoforma glutathionperoxidasové proteinové rodiny a je důležitým antioxidačním enzymem. Tento enzym je důležitý při detoxifikaci peroxidu vodíku, k čemuž používá redukovaný glutathion (GSH) jako donor elektronů (Santos *et al.*, 2018).

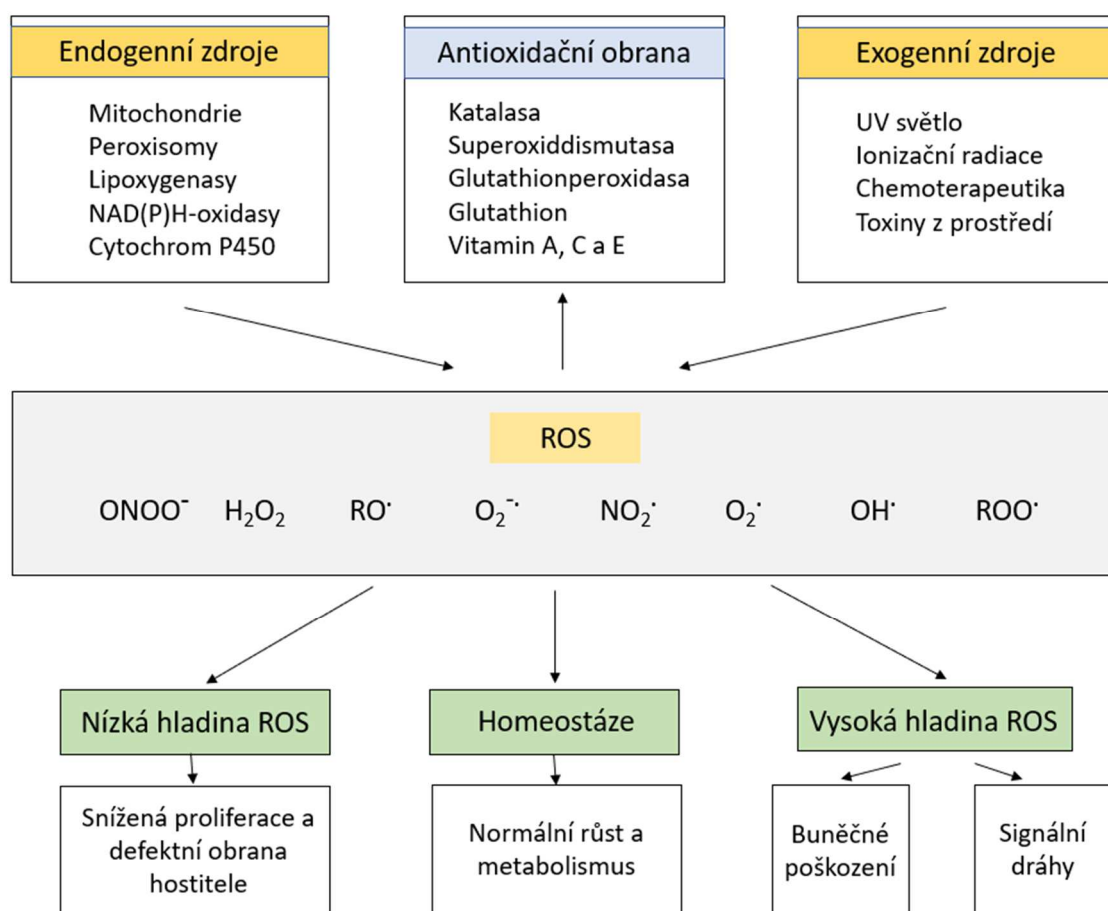
Mezi neenzymatické složky obranného systému patří fenoly, vitaminy (vitamin A, C a E); dále například glutathion či karotenoidy, flavonoidy a další (Carocho a Ferreira, 2013). Vitamin C neboli kyselina askorbová obsahuje dvě látky s antioxidační aktivitou, a to kyseliny L-askorbovou a L-dehydroaskorbovou. Vitamin E zastavuje lipidickou

peroxidaci tím, že daruje fenolický vodík peroxylovému radikálu. Flavonoidy jsou obsáhlá skupina antioxidantů. Jejich antioxidační aktivitu zde zajišťují hydroxylové skupiny, které jsou navázány na kruhové struktury (Carocho a Ferreira, 2013). Karotenoidy, jako je β -karoten a lykopen se chovají jako antioxidanty v biologických systémech. Jejich aktivita je založena na struktuře molekuly, a to převážně na přítomnosti konjugované dvojně vazby, která je důležitá při transferu energie. Karotenoidy mohou interagovat s volnými radikály třemi různými způsoby, a to transferem elektronů, abstrakcí vodíku či adicí radikálu (Young a Lowe, 2001). Mezi další neenzymatické antioxidanty patří například Koenzym Q10, kyselina močová a glutathion. Glutathion je endogenní tripeptid ochraňující buňku před volnými radikály. Daruje svůj vodíkový atom či elektron, a tím zhasí radikál. Hraje také důležitou roli při regeneraci dalších antioxidantů, jako je askorbát (Carocho a Ferreira, 2013).



Obr. 1 Rozdělení antioxidantů (Carocho a Ferreira, 2013).

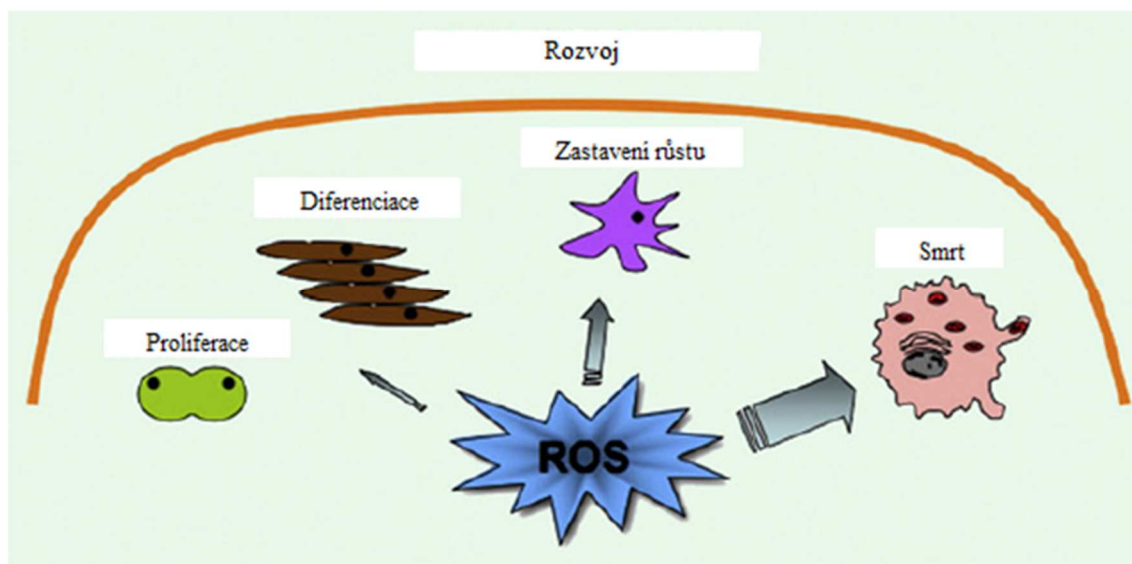
ROS mohou být příčinou vzniku buněčného stresu, který může vést ke smrti buňky apoptosou či nekrosou (Dalle-Donne, 2006). Výše zmíněné antioxidanty regulují jejich hladinu a udržují tak homeostázu. Pokud antioxidanty sníží hladinu ROS pod homeostatickou hodnotu, může být narušena fyziologická funkce oxidantů v proliferaci buněk a při obraně hostitele. Stejně tak i zvýšená koncentrace ROS je škodlivá, může vést k již zmíněné buněčné smrti nebo k urychlení stárnutí a rozvoje s ním spojených nemocí (Santos *et al.*, 2018). Poškozovány jsou převážně makromolekuly. Kromě těchto účinků může zvýšená hladina ROS představovat stresový signál, který aktivuje specifické signální dráhy citlivé na redoxní změny. Po aktivaci mohou mít tyto signální dráhy buď škodlivé, nebo ochranné funkce (Santos *et al.*, 2018). Obr. 2 zobrazuje schéma popisující tyto děje.



Obr. 2 Souhrn zdrojů ROS a následné buněčné odpovědi (Santos *et al.*, 2018).

2.2 Fyziologické účinky ROS

Reaktivní sloučeniny kyslíku hrají v organismu řadu důležitých fyziologických funkcí. Účastní se zánětlivých a obranných reakcí, uplatňují se v regulaci buněčného cyklu a fungují jako signální molekuly buněčných dějů. Výhodou využití ROS jako signálních molekul je ta skutečnost, že existuje mnoho typů kyslíkových radikálů, které mají odlišné vlastnosti. Kyslíkové radikály iniciují biochemické reakce, u nichž dále ovlivňují jejich směr a rychlost. Aktivita několika molekul je buď přímo, nebo nepřímo regulována oxidačním stresem (Covarrubias *et al.*, 2008). Mnoho molekul relevantních pro vývoj je citlivých na působení ROS, proto jsou ROS považovány za regulátory buněčných procesů, jako je proliferace, diferenciace, smrt či migrace (Obr. 3). Rozdílné hladiny ROS indukují specifické buněčné procesy. Malé množství ROS je mitogenní či podporuje diferenciaci, na rozdíl od většího množství ROS, které způsobuje zastavení růstu. V případě, že je množství ROS ještě větší, dojde k aktivaci apoptózy (Covarrubias *et al.*, 2008). Mezi fyziologické děje, kde jsou ROS zapojeny, patří i fagocytóza. Fagocytóza je proces, kdy dochází k odstranění zbytků mrtvých buněk či k pohlcování a usmrcení bakterií. V jedné z fází fagocytózy dochází k produkci ROS. Proces tvorby ROS se zde nazývá oxidační vzplanutí, a podílí se na něm enzymy NADPH-oxidasa a myeloperoxidasa (Štípek, 2000).



Obr. 3 Buněčné procesy, které jsou ovlivňovány ROS (převzato z (Covarrubias *et al.*, 2008)).

Buněčné pochody jsou řízeny signály, a to jak extracelulárními (za pomoci primárních posílů), tak intracelulárními (pomocí sekundárních a terciálních posílů). ROS jsou brány jako sekundární poslové, kteří předávají zprávu z extracelulárního prostředí a generují tak specifickou buněčnou odpověď (Covarrubias *et al.*, 2008). Tyto signály ovlivňují aktivitu enzymů a expresi genů. Primární ROS jsou dobře kontrolovány enzymy jako je superoxiddismutasa a katalasa, a jejich reakce s biomolekulami jsou vratné. Jsou tedy ideální pro fyziologickou či patofyziologickou intracelulární signalizaci. Signální kaskády, ve kterých jsou zapojeny ROS, regulují procesy jako je syntéza insulinu, aktivace HIF, proliferace buněk, diferenciacce a migrace (Weidinger a Kozlov, 2015). Stimulace řady receptorů růstových faktorů a cytokininů aktivně podporuje produkci ROS. Různé receptory signálních drah nejen že odpovídají na redoxní změny buněk, ale také se aktivně podílejí na rozvoji redoxních změn uvnitř buněk. Nejznámějším je pak již zmíněné oxidační vzplanutí, ke kterému dochází u fagocytujících buněk (Covarrubias *et al.*, 2008).

Velké množství proteinů důležitých pro rozvoj je citlivých na oxidační stres. Proteiny jsou často modifikovány na cysteinových residuích, avšak i další aminokyseliny mohou být modifikovány (Tyr, Trp, His atd.). Velké množství makromolekul je citlivých na redoxní modifikace pomocí ROS. Jsou to například fosfatázy, kinázy a velké množství transkripčních faktorů (Covarrubias *et al.*, 2008).

Kromě posttranslačních modifikací na signálních proteinech mohou ROS vyvolat transkripční aktivaci specifických genů. Bylo zjištěno, že transkripční faktory, které jsou zapojeny v reakci na oxidační stres, hrají zásadní roli ve vývojových procesech. Například, NF- κ B neboli nuclear factor κ B, je indukován v reakci na zvýšenou koncentraci ROS a jeho činnost je regulována systémem Trx / Ref1 (Covarrubias *et al.*, 2008). Tento faktor je kyslíkovými radikály aktivován, což mu umožňuje přesun z cytosolu do jádra, kde se váže na DNA. Zde pak dochází k aktivaci exprese několika cílových genů pro kódování růstových faktorů, cytokinů a proteinů akutní fáze (Štípek, 2000). NF- κ B proteiny mimo to, že působí v procesech jako je růst, proliferace atd., mají klíčovou roli v imunitním systému. Přes tento transkripční faktor v Imd dráze ROS ovlivňují dráhy pro expresi antimikrobiálních peptidů. Antimikrobiální peptidy (Amp) jsou jednou z obranných složek organismů vůči patogenům (více v kapitole 2.4) (Brutscher *et al.*, 2015). Reaktivní formy kyslíku ale interagují s těmito transkripčními

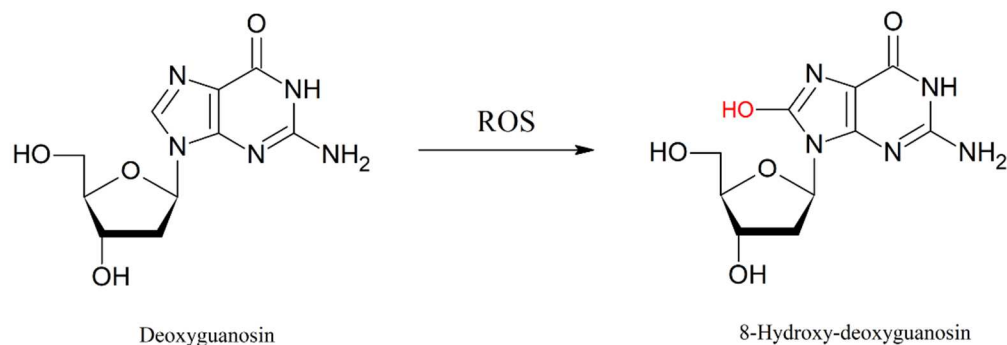
faktory hned několika způsoby, které jsou často protichůdné. NF- κ B regulační geny se účastní regulace množství ROS v buňce, ale na druhou stranu mají ROS inhibiční či stimulační funkci v NF- κ B signalizaci. NF- κ B zvyšuje expresi antioxidantních proteinů, čímž ovlivňuje hladinu ROS v buňce (Morgan a Liu, 2011). Většinou exprese genů NF- κ B podporuje přežití buněk, ale vyskytují se i případy, kdy dochází k buněčné smrti (Perkins a Gilmore, 2006).

2.3 Škodlivé vlivy ROS

Bylo prokázáno, že kyslíkové radikály způsobují poškození buněčných komponent i degradují řadu makromolekul. Buněčné oxidační poškození se rozvíjí, pokud rovnováha mezi produkcí a detoxifikací ROS není ustanovena. Mezi modifikace způsobené ROS patří lipidická peroxidace, karbonylace proteinů a modifikace nukleových kyselin (Miwa a Beckman, 2008). K oxidaci lipidů dochází v případě, že ROS působí na tyto molekuly. Lipidická peroxidace je významná u membránových lipidů. Jejich oxidací pak dochází ke ztrátě dvojných vazeb, což vede ke ztrátě fluidity a propustnosti membrán. Zároveň jsou na membránách vázány enzymy, které vlivem lipidické peroxidace mohou ztratit svou funkci (Valko *et al.*, 2007; Štípek, 2000).

Působením kyslíkových radikálů na proteiny může docházet k nefyziologickým změnám jejich struktury (zesíťování a agregace struktur, fragmentace, modifikace benzenových jader AMK a thiolových skupin). Tyto změny mohou vést ke změně až ztrátě aktivity enzymu, přičemž ireversibilní změny vedou až k buněčnému poškození. Významné jsou oxidační modifikace strukturních proteinů a enzymů, které hrají důležitou roli v rozvoji některých nemocí (ateroskleróza, artritida, *diabetes mellitus* aj.) (Baltacioglu *et al.*, 2008).

V případě, že ROS reagují s nukleovou kyselinou (DNA či RNA), dochází nejčastěji k hydroxylaci bází (Obr. 4). Tato modifikace ovlivňuje párování bází, což postupně vede ke vzniku bodových mutací, chybné translaci a následné chybné proteosyntéze. To může v konečném důsledku zapříčinit karcinogenezi či apoptózu (Štípek, 2000; Valko *et al.*, 2004).



Obr. 4 Hydroxylační reakce deoxyguanosinu v DNA (upraveno dle (Kasai, 1986)).

Jelikož ROS mají krátký poločas života, *in vivo* se vyskytují ve velmi nízkých koncentracích, a proto je velmi obtížné je studovat. Alternativou je měření koncových produktů oxidačního poškození způsobeného právě ROS. Markerem oxidačního poškození je taková látka, jejíž množství se zvýší v přítomnosti oxidačního stresu. A naopak při absenci oxidačního stresu zůstává množství markeru nezměněno (Miwa a Beckman, 2008). Více v kapitole 2.5.

2.3.1 Lipidická peroxidace (LPX)

Lipidická peroxidace se může rozvíjet jak neenzymatickou, tak i enzymatickou cestou. Enzymatická peroxidace lipidů je katalyzována enzymy jako je například lipoxygenasa či cyklooxygenasa (COX). Mezi iniciátory neenzymatické peroxidace patří superoxidový anionradikál a hydroxylový radikál. Redukce železitého iontu na železnatý prostřednictvím superoxidu je jedním ze způsobů iniciace LPX. Tento ion je následně schopen katalyzovat tvorbu hydroxylového radikálu Fentonovou reakcí (1). Dalšími iniciátory mohou být například xenobiotika či fagocytující buňky (Denisov a Afanas'ev, 2005).

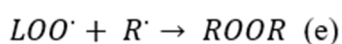
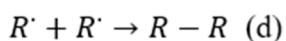
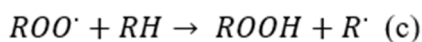
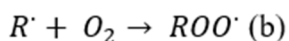
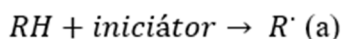
Reakce lipidické peroxidace jsou obvykle volnými radikály řízené řetězové reakce, kde jeden radikál může indukovat oxidaci poměrně velkého množství substrátu (např. polynenasycené mastné kyseliny, tzv. PUFA). Celý proces, který je znázorněn na (Obr. 5), sestává z iniciace (*a*), propagace (*b*) a terminace (*d*) (Abuja a Albertini, 2001). V iniciačním kroku je vytvořen volný radikál R' (Obr. 5, reakce *a*), který pochází z nenasycené lipidové molekuly. Nejčastějšími iniciátory lipidické peroxidace v buňkách jsou právě ROS, například hydroxylový a peroxidový radikál. Vznikající radikál není příliš stabilní, tudíž hned vzápětí nastává druhý krok, a to propagace. V propagačním

kroku reaguje volný radikál $R\cdot$ s molekulou kyslíku a vzniká tak peroxylový lipidový radikál $ROO\cdot$ (Obr. 5, reakce *b*). Tento peroxylový radikál rovněž není příliš stabilní, takže v následujícím kroku může reagovat s další nenasycenou lipidovou molekulou (Obr. 5, reakce *c*) (StAngelo, 1996). A jak je známo, pokud radikál reaguje s neradikálovou molekulou, vždy je produkován další radikál. Touto reakcí je tedy generován hydroperoxid $ROOH$ a další lipidový radikál $R\cdot$. Takto může řetězová reakce pokračovat, protože nově vznikající radikály reagují stejně. Radikálová řetězová reakce se zastaví až ve chvíli, kdy spolu reagují dva radikály a vytvoří neradikálový produkt (Obr. 5, reakce *d* a *e*). Toto však nastává až při dostatečně vysoké koncentraci radikálových molekul. Tento proces se nazývá terminace (StAngelo, 1996).

Následkem oxidačního poškození vznikají již zmíněné lipidové hydroperoxydy, které jsou následně rozkládány na aldehydy, ketony, alkoholy, kyseliny či uhlovodíky (StAngelo, 1996). Jedním z nejdůležitějších produktů oxidace je malondialdehyd (MDA), což je látka s mutagenními vlastnostmi a také je to jeden z iniciátorů karcinogeneze. MDA bývá často používán jako marker oxidačního poškození v biologických vzorcích (Kinter, 1995).

Pokud lipidová peroxidace proběhne na membráně, dojde k okamžitému snížení fluidity, a naopak iontová permeabilita membrány se zvýší. Pokud je úroveň lipidické peroxidace dostatečně vysoká, vede to ke ztrátě vlastností a funkcí membrány. Například může dojít ke ztrátě funkce tzv. bariéry, k lýzi buněk a až k buněčné smrti. Iontový gradient hraje důležitou roli hned v několika fyziologických procesech, jako je energetický metabolismus ve vnitřní mitochondriální membráně a vodivost nervu v plasmatické membráně (Miwa a Beckman, 2008).

Vitamin E (α -tocopherol) hraje klíčovou roli v minimalizaci poškození způsobeného lipidickou peroxidací (Miwa a Beckman, 2008).



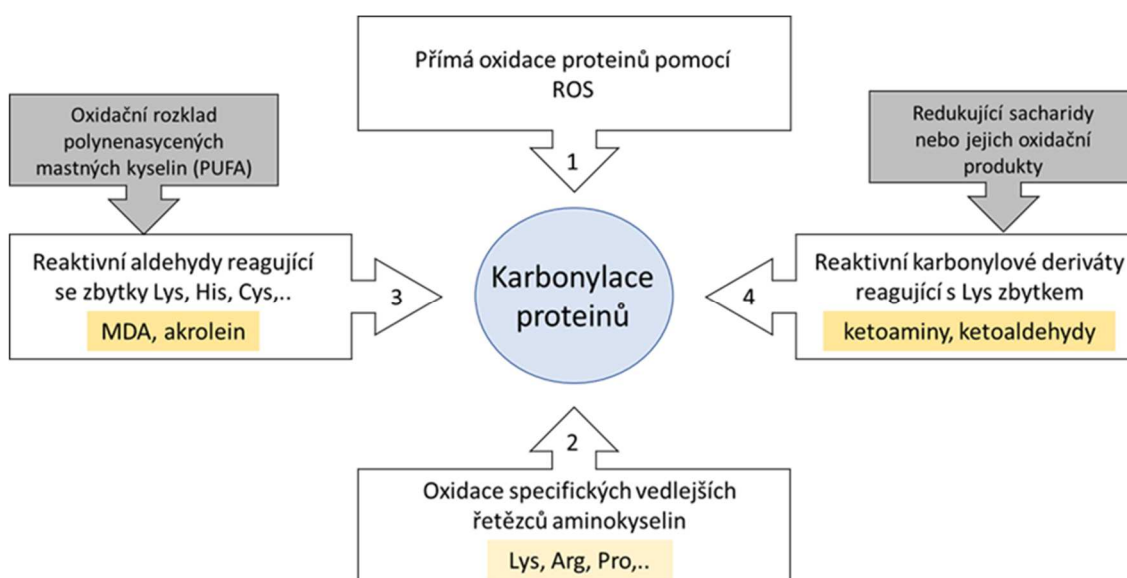
Obr. 5 Reakce lipidické peroxidace (upraveno dle (StAngelo, 1996))

2.3.2 Karbonylace proteinů (PCO)

Proteiny jsou jedním z hlavních cílů oxidačního poškození, jelikož jsou hlavním komponentem většiny biologických systémů a pohlcují velké množství reaktivních částic a radikálů (Dalle-Donne, 2006). Některé z proteinových modifikací, které byly indukovány reaktivními formami kyslíku, mohou být neškodné, avšak většina vede až k pozměnění či úplnému rozbalení proteinové struktury (Baltacioglu *et al.*, 2008). Mezi neškodné modifikace patří například reversibilní proteinové modifikace, jako jsou S-glutathionová a methioninová sulfoxidace, které mohou sloužit jako ochrana proti nevratné oxidaci a modulaci funkce proteinů (Dalle-Donne, 2006). Naopak ireversibilní proteinové modifikace mohou vést až k inaktivaci proteinů a mohou mít zhoubný efekt pro buňku. Mnoho druhů proteinových oxidačních modifikací bývá indukováno právě pomocí ROS (Baltacioglu *et al.*, 2008).

Karbonylace je pak nevratná neenzymatická modifikace proteinů, která často vede ke ztrátě jejich funkce (Dalle-Donne, 2006). Proteinové karbonylové deriváty mohou být produkovány řadou oxidačních cest, které jsou znázorněny na (Obr. 6). Reaktivní formy kyslíku mohou reagovat přímo s proteiny, čímž poskytují vysoce reaktivní karbonylové deriváty vzniklé štěpením peptidové vazby α -amidací nebo oxidací glutamylových zbytků (cesta č. 1). Další možností je přímá oxidace postranních řetězců specifických aminokyselin; jako je lysin, arginin, prolin a threonin. Oxidace zde probíhá zejména díky kovové katalýze (cesta č. 2). Další možností je přitažení reaktivních aldehydů pocházejících z kovem katalyzované oxidace polynenasycených mastných kyselin. Tyto aldehydy (například malondialdehyd, akrolein atd.) následně reagují se zbytky aminokyselin lysinu, histidinu a cysteinu (cesta č. 3). Nakonec, karbonylové skupiny

mohou být generovány reakcí primární aminoskupiny lysinového zbytku s reaktivními karbonylovými deriváty, což jsou například ketoaminy a ketoaldehydy pocházející z reakcí redukujících cukrů nebo jejich oxidačních produktů s lysinovými zbytky (cesta č. 4) (Dalle-Donne, 2006; Miwa a Beckman, 2008; Baltacıoglu *et al.*, 2008). Karbonylace je také jedním z indikátorů těžkého oxidačního poškození a proteinové dysfunkce způsobené nějakým závažným onemocněním (Baltacıoglu *et al.*, 2008).



Obr. 6 Původ karbonylovaných proteinů (upraveno dle (Dalle-Donne, 2006))

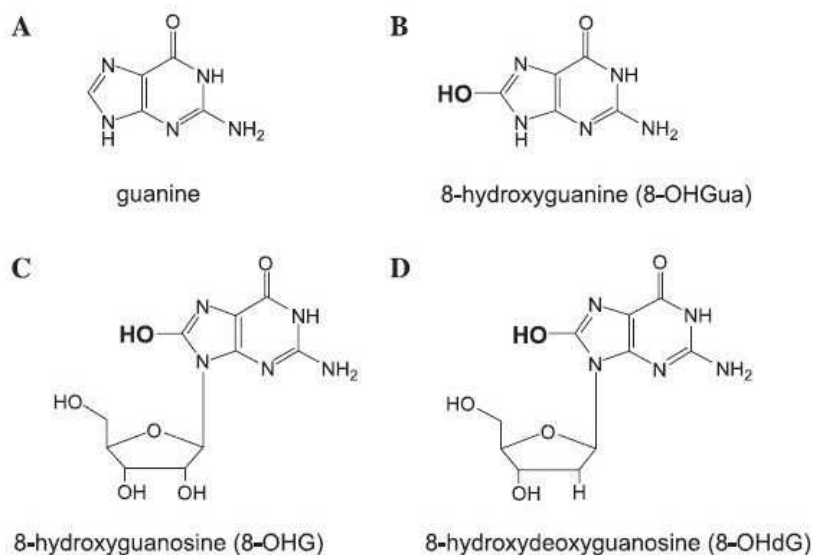
Proteiny, na rozdíl od nukleových kyselin, nemohou být po oxidačním poškození opraveny. Nukleové kyseliny disponují reparačními mechanismy, kdy dochází k vyříznutí a nahrazení poškozené části řetězce. Opravit oxidované proteiny není možné, proto nastává jejich degradace na jednotlivé aminokyseliny, a to pomocí různých endogenních proteas (Denisov a Afanas'ev, 2005). Mírně karbonylované proteiny jsou degradovány proteasomálním systémem, avšak těžce karbonylované proteiny agregují a tím se stávají resistantní proti degradaci (Dalle-Donne, 2006). Oxidační modifikace enzymů a strukturních proteinů hraje důležitou roli v původu a rozvoji některých nemocí. Velké množství neurodegenerativních nemocí je spojeno s akumulací karbonylovaných proteinů v tkáních. Mezi tyto nemoci patří například Alzheimerova a Parkinsonova nemoc, katarakt, artritida, *diabetes mellitus* a ateroskleróza (Baltacioglu *et al.*, 2008).

Karbonylace proteinů je široce využívaný biomarker oxidačního poškození proteinů a vyjadřuje buněčné poškození vyvolané různými formami ROS (Dalle-Donne, 2006). Stejně jako lipidy, i proteiny mohou být před oxidací ochráněny pomocí antioxidantů a tzv. zhášeců volných radikálů. Mezi tyto ochranné látky patří například glutathion, vitamin E, pyridoxamin atd (Denisov a Afanas'ev, 2005).

2.3.3 Oxidační poškození DNA

Volné radikály mohou poškozovat i nukleové kyseliny, které jsou snadný cíl pro oxidanty jako například ROS (Denisov a Afanas'ev, 2005). DNA poškození způsobené ROS se dělí na dvě skupiny, a to poškození nukleotidových bází nebo lámání vláken DNA (Miwa a Beckman, 2008). V buňce probíhá soutěž mezi adicí hydroxylových radikálů do bází a odebráním vodíkového atomu ze sacharidů, a to hydroxylovým radikálem (Denisov a Afanas'ev, 2005). Ze všech purinových a pyridinových bází je k oxidaci nejvíce náchylný guanin. V rámci oxidace je hydroxylová skupina navázána na pozici 8 v guaninové molekule, a vzniká tak oxidační produkt 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), což je zároveň i marker DNA oxidace (Obr. 7) (Wu *et al.*, 2004). Tento hydroxylovaný guanin se páruje jak s adeninem, tak i s cytosinem, tím způsobuje řadu mutací a hraje roli v karcinogenezi a stárnutí (Barzilai a Yamamoto, 2004; Lengger *et al.*, 2000). V souvislosti s poškozením DNA je často zmiňován hydroxylový radikál vznikající ve Fentonově reakci (1). Hydroxylové radikály jsou schopny odebrat vodíkový atom DNA deoxyribose, což vede k vytvoření jednovláknového zlomu v molekule DNA.

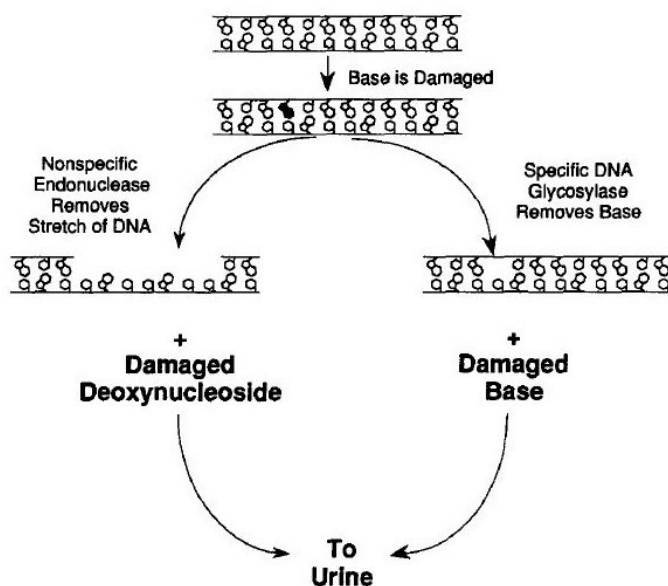
Jednovláknové zlomy nejsou nutně letální, jelikož mohou být enzymaticky opraveny. V případě dvouvláknového zlomu, který nastává při mnohonásobném ataku hydroxylových radikálů, je smrt buňky velmi pravděpodobná (Denisov a Afanas'ev, 2005).



Obr. 7 Chemická struktura 8-OHdG a jeho analogů: (A) struktura nemodifikované guaninové báze, (B) struktura oxidované báze, (C) analog 8-OHG z RNA, (D) struktura 8-OHdG z DNA (převzato z (Wu *et al.*, 2004))

Existuje specifická a nespecifická forma opravy DNA (Obr. 8). Enzymatický mechanismus je odpovědný za rozpoznání, vyříznutí a nahrazení poškozených struktur těmi normálními. Nespecifická enzymová oprava pomocí endonukleasy je založena na vynechání poškozené části DNA a tím uvolňuje deoxynukleotidy, zatímco specifické DNA-opravné glykosylasy odstraňují poškozenou bázi, a uvolňují volné báze. Deoxynukleotidy uvolněné při nespecifické opravě jsou enzymaticky hydrolyzovány na deoxynukleosidy, které nadále nejsou metabolizovány. Tyto deoxynukleosidy i volné báze jsou vylučovány močí (Shigenaga a Ames, 1991). Aby byl pro opravu DNA dostatek času, buňky aktivují své kontrolní body v rámci buněčného cyklu, což vede k pozastavení buněčného cyklu a předchází tak replikaci poškozené, defektní DNA (Barzilai a Yamamoto, 2004).

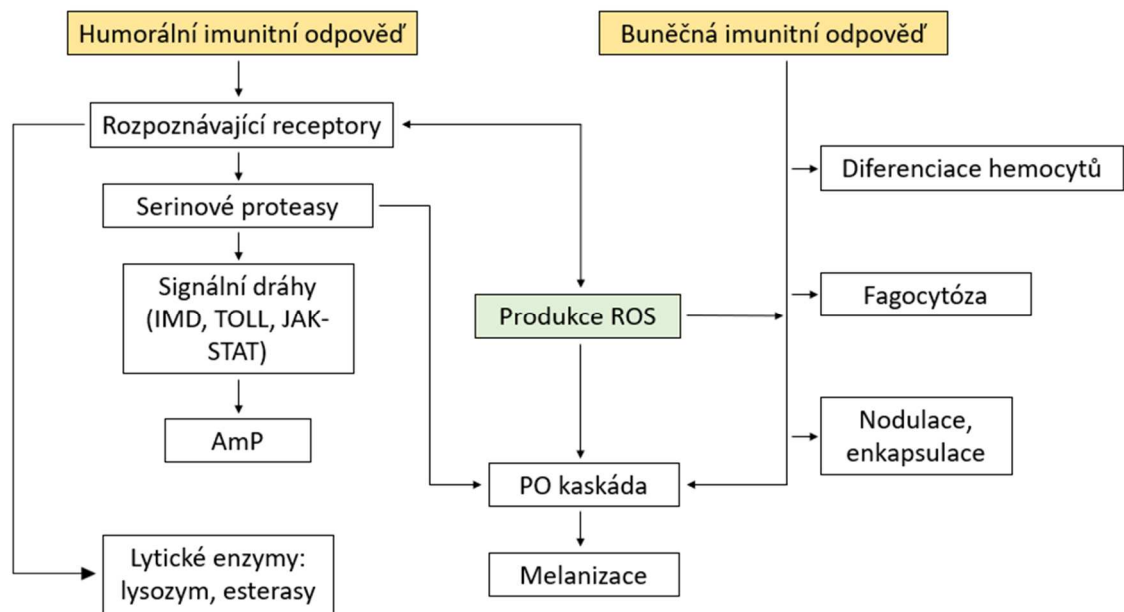
Všeobecně všechny tradiční antioxidanty a zhaščeče volných radikálů jsou schopny inhibovat poškození DNA způsobené ROS. Například flavonoidy a flavony se zdají být velmi efektivní při inhibici tohoto poškození. Antioxidační enzymy superoxididismutasa a katalasa taktéž ochraňují DNA před ROS způsobenou degradací (Denisov a Afanas'ev, 2005).



Obr. 8 Oprava poškozené DNA báze pomocí nespecifické endonukleasy nebo specifické glykosylasy (převzata a upraveno dle (Shigenaga a Ames, 1991))

2.4 Propojení drah oxidačního stresu a imunity

Imunitní systém obecně představuje obranu proti vnějším a vnitřním biologickým vlivům. Obranný mechanismus hmyzu lze rozdělit do tří úrovní. První obranou jsou fyzikální bariéry, mezi které patří kutikula, stěna střev, tracheje a peritrofická membrána. Za druhý stupeň obrany je považována buněčná imunita, která je velmi úzce spjata s poslední úrovní imunity, a to humorální složkou (Antunez *et al.*, 2009). Humorální a buněčnou imunitu nelze zcela oddělit, protože velká řada humorálních faktorů je zapojena v regulaci aktivity hemocytů a naopak, hemocyty produkují mnoho obranných molekul (Obr. 9). V rámci humorální imunity dochází k aktivaci profenoloxidasového systému, k produkci ROS, RNS, či antimikrobiálních peptidů (Borba *et al.*, 2015). U sociálního hmyzu existuje také tzv. sociální imunita, která je založena na specifickém chování jedinců ve společnosti. Hraje důležitou roli v udržení včelstva, ale nutně neochraňuje individuální členy včelstva (Daníhlik *et al.*, 2015).



Obr. 9 Schéma znázorňující dráhy imunitního systému (upraveno dle (James a Xu, 2012)).

Mitochondrie jsou považovány za důležité zprostředkovatele imunitní odpovědi, a to nejenom protože jsou zdrojem energie potřebné pro imunitní odpověď, ale hlavně díky vedlejším produktům mitochondriálního metabolismu, jako například ROS. Mitochondriální ROS jsou produkovány ve všech buňkách s mitochondriemi a jsou zapojeny v regulaci signálních drah, apoptóze, zánětu a diferenciaci. ROS jsou také zapojeny v regulaci imunitních signálních drah. Mají roli jak v humorální, tak buněčné vrozené imunitě. Mimo jiné slouží k přímé eliminaci patogenů, a to díky svým mikrobicidním efektům. ROS slouží také k signalizaci pro proliferaci a diferenciaci hemocytů u octomilky (*Drosophila melanogaaster*) (Salminen a Vale, 2020).

Imunitní reakce u včel a s ní spojený oxidační stres může být vyvolán jak přírodní cestou (řadou patogenů a parazitů), tak vlivem prostředí a cizorodých látek. Mezi tyto xenobiotika patří například léčiva, pesticidy, polutanty či alkaloidy. Například organofosfáty, což je jeden z mnoha typů pesticidů, způsobuje pokles počtu hemocytů a ovlivňují fagocytózu (James a Xu, 2012).

2.4.1 Fyzikální bariéry

Včely (stejně jako ostatní hmyz) mají povrch těla pokrytý kutikulou, která se skládá z chitinu, sklerotinu a lipidů. Kutikula také vystýlá tracheje a přední a zadní střevo. Brání tak patogenům proniknout dovnitř do tkání. Nejčastěji se patogeny do organismu dostávají přes trávicí ústrojí, kdy včela tento patogen pozře, čímž se dostane do středního střeva, které není chráněno kutikulou.

2.4.2 Buněčná imunita

Buněčnou imunitu u včel představují hemocyty, které jsou volně rozptýleny v hemolymfě, a které brání organismus za pomoci fagocytózy, enkapsulace či nodulace (Borba *et al.*, 2015). U včel bylo popsáno několik druhů hemocytů, které se liší svou morfologií či funkcí. Jsou to například progenitorové buňky, plasmatocyty, granulocyty, oenocyty či koagulocyty. Různé hemocyty mají různé role v imunitních reakcích a ochraně organismu. Malé cizorodé částice (například patogeny) mohou být pohlceny fagocytózou, zatímco větší patogeny či shluky buněk jsou obaleny větším množstvím hemocytů a enkapsulovány. Po enkapsulaci se k patogenu nedostává potrava ani vzduch a patogen umírá. Nodulace je pak odpovědí na velké množství cizích buněk.

2.4.3 Humorální imunita

Humorální imunita je zprostředkována látkami přítomnými v hemolymfě a nebuněčnými reakcemi. Tyto látky jsou produkovány tukovým tělesem či hemocyty. Některé z faktorů jsou v hemolymfě přítomny neustále (např. lektiny), další jsou produkovány v závislosti na životním stádiu (fenoloxidas), nebo jsou vyvolány a sekretovány v odpovědi na mikrobiální infekci (AmP) (Daníhlik *et al.*, 2015).

2.4.3.1 Lysozym

Lysozym je enzym se silnými antibakteriálními účinky, štěpící glykosidickou vazbu mezi kyselinami ve vrstvě peptidoglykanu buněčné stěny bakterií. U včel pak existují celkem tři typy lysozymu (Evans *et al.*, 2006). Je to enzym, který obsahuje intramolekulární disulfidické můstky, díky čemuž je tepelně stabilní.

2.4.3.2 Lektiny

Lektiny jsou proteiny, které mají schopnost shlukovat. Interagují se sacharidy na povrchu buněk, což zapříčiní jejich shlukování a navázání na sebe. Tyto interakce jsou důležité hned ve dvou aspektech imunitní odpovědi. Prvním z nich je rozpoznání patogenu, a druhou je buněčná interakce vedoucí ke zneškodnění patogenu. Aglutininy, které se řadí mezi lektiny, se účastní enkapsulace a aktivace profenoloxidas.

2.4.3.3 Fenoloxidas

Důležitou složkou imunitního systému včel je fenoloxidasová kaskáda. Celou kaskádu lze rozdělit na tři části, kdy první z nich je profenoloxidasu aktivující systém (proPO-AS), dále dochází k aktivaci profenoloxidas (proPO) na aktivní fenoloxidasu (PO). Fenoloxidas patří do třídy oxidoreduktas a je syntetizován ve formě neaktivního zymogenu profenoloxidas (proPO). Tento zymogen je postupnou kaskádou molekul (lipopolysacharidy, peptidoglykany či glukany) aktivován. Posledním krokem je fenoloxidasou katalyzovaná oxidace fenolů na reaktivní a toxické chinony. Ty jsou následně neenzymaticky přeměněny až na výsledný produkt melanin. Melanin je tmavá nerozpustná látka, která hraje roli při ochraně proti patogenům, při hojení ran a má vliv na zbarvení kutikuly. Enzymatické reakce v rámci kaskády mají za následek produkci

dalších látek, například ROS a RNS (Gonzalez-Santoyo a Cordoba-Aguilar, 2012). Produkty PO aktivity stimulují fagocytózu a enkapsulaci.

2.4.3.4 Antimikrobiální peptidy (AmP)

Antimikrobiální peptidy jsou jednou ze složek primární imunitní reakce. U hmyzu bylo popsáno přes 200 druhů AmP, avšak pouze omezené množství bylo detekováno v genomu včely (Evans *et al.*, 2006). AmP dokáží zabít většinu bakteriálních kmenů a hub. Jsou tvořeny převážně v tukovém tělese, dále pak v hemocytech, střevech či epitelu kutikuly a následně jsou uvolněny do hemolymfy. Dráhy vedoucí k tvorbě AmP jsou aktivovány molekulami, které se nachází na stěnách mikrobů (Randolt *et al.*, 2008). Po napadení patogenem dochází k indukci syntézy AmP pomocí fagocytů, následuje sekrece signálních molekul z hemocytů. Poté jsou fagocyty přichyceny k tukovému tělesu a dochází k endokrinní regulaci syntézy AmP. Hmyzí antimikrobiální peptidy se skládají z méně než 50 AMK a jsou amfipatické povahy. Většina druhů AmP je syntetizovaných v reakci na infekci (apidaeciny, abaecin, hymenoptaecin a defensiny), avšak existují i jiné AmP, které jsou přítomné i bez indukce patogenem. Jedná se o royalisin a jelleiny, které hrají roli v sociální imunitě a jsou vylučovány do mateří kašičky. Dalším včelím antimikrobiálním peptidem je mellitin, který je součástí včelího jedu. Je to peptid poškozující buněčné membrány, čímž způsobuje rozklad erythrocytů, leukocytů i trombocytů (Ownby *et al.*, 1997).

AmP patří mezi molekuly s velkým množstvím různých antimikrobiálních aktivit. Jak již bylo zmíněno, většina z nich jsou kationické či amfipatické peptidy, které interagují se záporně nabitými lipidovými membránami obsahujícími lipopolysacharidy, peptidoglykany a glukany, které naruší. Vytvoří se tak kanály, kterými unikají esenciální metabolity a ionty, či dojde k penetraci velkých molekul (peptidů či proteinů), což je pro bakterie fatální. Další z mechanismů působení peptidů je tvorba interakcí mezi AmP a vnitřními proteiny (DNA, RNA či s dalšími kompartmenty) mikrobiálních buněk. Defensin je peptid aktivní vůči různým druhům grampozitivních (G+) bakterií, avšak o něco méně působí na gramnegativní (G-) bakterie. Defensiny tvoří póry v cílových membránách, čímž umožní vstup peptidů do cytosolu buněk (Ganz, 2003). Apidaecin a abaecin mají velmi podobné sekvence AMK. Tyto peptidy mají vysokou aktivitu vůči

G- bakteriím. Hymenoptaecin je malý protein inhibující jak G- bakterie, tak G+ bakterie. Royalisin nejenom že inhibuje růst G+ bakterií, ale má současně i vliv na růst hub.

Expresí AmP je regulována převážně dvěma intracelulárními signálními drahami – Toll a Imd/JNK. Toll dráha je aktivována receptory pro rozpoznání patogenů (PRR), mezi které patří peptidoglykanové receptorové proteiny, G- vázající proteiny atd., které vážou houbové či bakteriální PAMPs. Po navázání PAMPs dojde pomocí serinové proteasové kaskády k rozštěpení pro-Spaetzle proteinu. Dalšími kroky dojde k degradaci NF-kB inhibitorů, což vede k uvolnění transkripčních faktorů Dorsal. Translokací Dorsal faktorů dojde ke zvýšené expresi AmP (Brutscher *et al.*, 2015). Imd dráha je aktivována proteinem pro rozpoznání peptidoglykanu (PGRP), který je vázán na peptidoglykan G- bakterií. Následuje aktivace adaptorového proteinu IMD, fosforylace Relishe a jeho následné rozštěpení Dredd kaspásou. Relish transkripčně reguluje expresi AmP a dalších genů zapojených v antimikrobiální obraně (Brutscher *et al.*, 2015). Míra genové exprese a syntézy peptidů je ovlivněna řadou biotických a abiotických faktorů (Evans *et al.*, 2006).

2.4.4 Sociální imunita

Sociální imunita je kolektivní obrana proti ektoparazitům, plynoucí ze spolupráce mezi jednotlivci. Sociální hmyz se často shlukuje a má nízkou genetickou variaci, proto je zde vysoké riziko přenosu patogenů a onemocnění. Včely dokáží snížit riziko propuknutí onemocnění, a to kombinací individuální imunitní reakce a sociální imunity (Cremer *et al.*, 2007). Mezi obranná chování sociální imunity patří grooming (odstranění prachu, pylu či ektoparazitů z těl), hygienické chování (odstranění nemocných či mrtvých larev a kukel) a sběr antimikrobiálních pryskyřic (Borba *et al.*, 2015). Imunitní reakce jedince je pak posílena při koordinovaném chování a při interakcích s ostatními členy společenstva. Tím je vyvolána kolektivní imunitní odpověď, jejíž reakce mají podobné vlastnosti jako buněčný a humorální systém u mnohobuněčného organismu (Cremer *et al.*, 2007).

2.5 Metody stanovení oxidačního poškození

2.5.1 Metody stanovení lipidické peroxidace

Metody pro stanovení lipidické peroxidace se dělí na stanovení prostřednictvím primárních nebo sekundárních koncových produktů. Mezi nejpoužívanější markery lipidické peroxidace patří malondialdehyd (MDA), 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) a další parametry jako jsou např. lipidické peroxidy (LOOH).

Malondialdehyd je jedním z nízkomolekulárních koncových produktů vzniklých rozpadem primárních a sekundárních produktů lipidické peroxidace. Používanou metodou pro měření MDA je metoda TBARS (thiobarbituric acid reactive substances), kdy MDA při nízkém pH a zvýšené teplotě reaguje nukleofilní adicí se dvěma molekulami TBA, a generuje růžový, fluoreskující produkt (Hodges *et al.*, 1999). Tento produkt lze stanovit jak spektrofotometricky (při 532 nm), tak i fluorescenčně (excitace 525 nm a emise při 560 nm). Specifita při spektrofotometrickém stanovení v tkáňových homogenátech je poměrně malá, jelikož TBA reaguje i s jinými molekulami a existuje řada interferujících látek s absorpčním maximem v okolí 532 nm. Výsledná koncentrace MDA tedy bývá nadhodnocena. Specifita metody lze zvýšit pomocí HPLC separace, kdy se stanovuje pouze daný MDA-TBA produkt od ostatních TBA vázajících substancí. HPLC na reverzní fázi s UV-VIS či fluorescenční detekcí může být pro tyto účely použita. Dalším z kroků zvyšující specifitu stanovení je derivatizace MDA za pomoci 2,4-dinitrophenylhydrazinu (DNPH) a konverze v pyrazolové a hydrazinové deriváty. Toto zvýšení specifity funguje také převážně v kombinaci s HPLC separací. Existuje několik variací metody MDA-TBA, avšak i přes své nevýhody je spektrofotometrické stanovení preferované, a to převážně díky své jednoduchosti, rychlosti a nízké ceně (Mendes *et al.*, 2009). HPLC stanovení je velmi specifické, avšak je poměrně drahé a časově náročné.

Lipidové hydroperoxidy bývají měřeny různými technikami a metodami, například HPLC stanovením, plynovou chromatografií, iodidovou oxidací či chemiluminiscencí. Ovšem tyto metody jsou časově náročné. Naopak metoda FOX2 (ferrous oxidation in xylenol orange version 2) je jednoduchá, levná a je velmi citlivá, dokáže stanovit i nanomolární množství lipidových hydroperoxidů (DeLong *et al.*, 2002). Lipidové hydroperoxidy jsou stanovovány spektrofotometricky, a stanovení je založeno na oxidaci

železnatých iontů na ionty železité, a to právě již zmíněnými hydroperoxydy v kyselém prostředí. Železité ionty následně tvoří komplex s xylenolovou oranží, což je indikátor železitých iontů. Tento komplex má modrofialové zbarvení s absorpčním maximem při 560 nm (Sodergren *et al.*, 1998). Aby byly stanovovány pouze hydroperoxydy, jsou vzorky měřeny ve dvou sadách, kdy první z nich obsahuje triphenylphosphin (TPP) v methanolu a druhá z nich pouze methanol. Informace o hladině hydroperoxidů jsou více fyziologicky relevantní, než-li informace o množství malondialdehydu, jako sekundárního koncového produktu oxidace polynenasycených mastných kyselin. K organickým reaktantům je přidáván butylovaný hydroxytoluen (BHT), který zde funguje jako antioxidant (Griffiths *et al.*, 2000). Existují dvě verze této metody, více používaná verze 2 umožňuje kvantifikaci malého množství lipidových hydroperoxidů v přítomnosti vysokého pozadí způsobeného neperoxidovanými mastnými kyselinami.

Další z markerů, 4-hydroxynonenal (4-HNE), patří mezi signální molekuly v organismu. Je to koncový produkt oxidace nenasycených mastných kyselin (jako je například kyselina arachidonová nebo linolová). 4-HNE bývá stanovován pomocí HPLC s UV detekcí. Avšak více používanou metodou je stanovení pomocí LC-MS/MS.

2.5.2 Metody stanovení poškození proteinů

Nejčastějším biomarkerem oxidačního poškození proteinů jsou karbonylované proteiny (PCO). Mezi metody stanovení PCO se řadí tzv. Levinova metoda, která je založena na reakci karbonylových skupin s modifikovaným hydrazinem (2,4-dinitrofenylhydrazin, DNPH). Tato reakce vede ke vzniku stabilního aduktu, který může být detekován spektrofotometricky (při 370 nm) (Pirinccioglu *et al.*, 2010). Nevýhodou je však interference chromoforů absorbujících při stejné vlnové délce, jako je hemoglobin, retinoidy a tak dále. Dále může DNPH reagovat s nukleovými kyselinami, které musí být předem vysráženy. Pro dosažení vyšší citlivosti a specifity se používá separace kapalinovou chromatografií (HPLC), což umožňuje frakcionaci proteinů a tím dostáváme informaci o zastoupení proteinů ve směsi. Mezi další z metod patří opět imunologická analýza ELISA, při níž jsou využívány anti-DPH protilátky. Nevýhodou tohoto stanovení je, že (stejně jako u kolorimetrického stanovení) neposkytuje informaci o oxidačním poškození jednotlivých proteinů ve směsi (Dalle-Donne *et al.*, 2003). Karbonylové deriváty lze také stanovit pomocí western blottingu, kterému ovšem předchází gelová

elektroforéza. Ta dělá analýzu delší, ale na druhou stranu zvyšuje specifitu. Jednou z možností je využití slot blottingu, což je jednodušší, časově i finančně úspornější verze western blottingu. Vynechává se zde totiž separace elektroforézou (Jamel *et al.*, 2010). Karbonylované proteiny mají na rozdíl od markerů lipidické peroxidace tu výhodu, že jsou stabilnější (Dalle-Donne *et al.*, 2003). Na druhou stranu, proteiny vždy přirozeně obsahují karbonylové skupiny, hodnoty tedy mohou být zkreslené.

Dalšími markery poškození proteinů mohou být deriváty tyrosinu, které vznikají při reakci volných radikálů s aminokyselinou tyrosinem. Toto stanovení není tak často využíváno jako stanovení karbonylových skupin, avšak je více specifické a patří mezi dobré ukazatele oxidačního poškození proteinů. Nejčastěji se tyto deriváty detekují hmotnostní spektrometrií. Nejběžněji stanovovaným derivátem je 3-nitrotyrosin, který je stanovován pomocí imunohistochemických metod či HPLC (Shacter, 2000).

2.5.3 Metody stanovení poškození nukleových kyselin

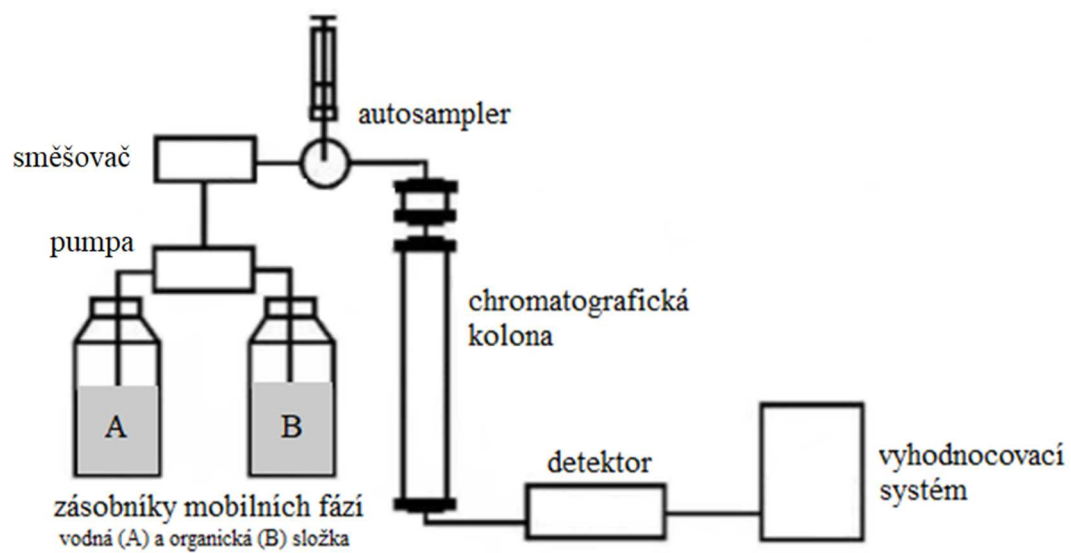
Nejvýznamnějším biomarkerem poškození nukleových kyselin je 8-hydroxy-2'-deoxyguanosin (8-OHdG). Při stanovování tohoto markeru je dosahováno velmi nízkých limitů detekce. DNA je v organismu zastoupena v nízkých koncentracích, proto se klade velký důraz na citlivost a specifitu používaných metod. Dříve se ke stanovení oxidačního poškození DNA využívaly převážně imunochemické metody, kometový test či papírová nebo tenkovrstvá chromatografie. Avšak těmito metodami se měří pouze jeden produkt v poškozené DNA a tyto techniky také neinformují o struktuře daného analytu. Mezi nejvíce používané stanovení patří analýzy pomocí hmotnostního spektrometru, čemuž předchází separace látek pomocí plynové či kapalinové chromatografie. Další z používaných metod je ELISA, která ale často nadhodnocuje množství tohoto markeru (Garratt *et al.*, 2010).

2.6 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) je jednou z velmi často využívaných separačních metod, a to zejména pro svou vysokou citlivost a selektivitu. Umožňuje analýzu velkého množství vzorků či složitých směsí. Tato metoda je založena na rozdělení látek mezi dvě různé nemísitelné fáze. První z nich je pohyblivá neboli mobilní fáze. Mezi běžné mobilní fáze pro HPLC patří kombinace vody s organickými

rozpouštědly. Druhou z fází je nepohyblivá stacionární fáze. Mobilní fáze, převážně pak její složení a teplota, ovlivňuje interakce mezi složkami vzorku a stacionární fází, čímž hraje důležitou roli v separačním procesu. Analyty interagují se stacionární fází rozdílně, proto se i v koloně zdržují rozdílnou dobu. Pokud je interakce slabá, je analyt eluován v krátkém čase, naopak silné interakce zapříčiní delší eluční čas, tzn. že složky vzorku jsou separovány na základě rozdílného stupně jejich interakce s částicemi sorbentu v koloně. Na fázovém rozhraní mezi stacionární a mobilní fází dochází k opakované sorpci a desorpci stanovovaných látek. Tento proces je charakterizován distribuční konstantou. Pro rozdělení dvou analytů se musí jejich distribuční konstanty dostatečně lišit. Eluce může být buď izokratická či gradientová. Při gradientové eluci je složení mobilní fáze měněno ve prospěch složky s vyšší eluční silou, naopak izokratická je založena na eluci mobilních složek o konstantním složení. Záznamem znázorňujícím jednotlivé analyty, a to ve formě chromatografických píků, je tzv. chromatogram (Nováková a Douša, 2013).

Instrumentace HPLC je znázorněna níže (Obr. 10). Mobilní fáze je míchána z organické a vodné složky, které se nachází v zásobních lahvích, a za pomoci vysokotlakého čerpadla je přiváděna na chromatografickou kolonu. Mezi čerpadlem a kolonou se nachází dávkovač vzorku neboli autosampler, ze kterého je mobilní fází vzorek unášen na kolonu, na které se analyt dělí. Za kolonou je umístěn detektor, který vysílá signál do vyhodnocovacího systému, obvykle PC. Analýza začíná nástřikem látky na kolonu. Vysokoučinná kapalinová chromatografie spojená s UV-VIS detekcí slouží k detekci a identifikaci fluorescenčních analytů ve vzorku. Princip UV-VIS detektoru je založený na absorpci světla při různých vlnových délkách. Koncentrační profil zóny je představovaný průběhem píku. Množství látky v zóně je shodná s plochou píku, proto je základním podkladem pro kvantitativní analýzu. Obsah látky v neznámém vzorku se na základě zjištěných ploch píku určuje relativně, proto je nutné použití standardu o známé koncentraci (Nováková a Douša, 2013).



Obr. 10 Schéma HPLC systému

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Biologický materiál

V rámci experimentální části bylo pracováno se vzorky včely medonosné (*Apis mellifera*). Pro optimalizaci metod byly použity včely, které byly odebrány v roce 2018 z experimentálních včelstev ze stanoviště na Kývalce, a to v průběžných odběrech. Vzorky byly po odebrání zamraženy a uchovány při -80°C .

3.1.1.1 Indukce oxidačního stresu chemicky - paraquatem

K ověření metod byly využity včely, u kterých byl uměle vyvolán oxidační stres. Příprava vzorku byla následovná. Rámek s plodem byl zaklíčkován a vložen do inkubátoru, který byl nastaven na teplotu $34,5^{\circ}\text{C}$. Čerstvě vylíhnuté včely byly odebrány a po dobu dvou minut zchlazeny na ledu. Následně byly injektovány $1\ \mu\text{l}$ paraquatu o koncentraci $2\ \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. Poté byly včely vloženy do klíček a opět vloženy do inkubátoru. Vzorky byly odebírány po 3 a 6 hodinách od aplikace injekce a ihned zamraženy. Paraquat je syntetická látka vyvolávající oxidační stres. Stejným způsobem byly ošetřeny i další vzorky, avšak namísto paraquatu jim byl injektován roztok PBS. Tyto včely sloužily jako kontrola pro oxidační stres vyvolaný mechanicky (vpichem). Pro tento experiment byla využita dvě včelstva, a to číslo 1 a 24. Další skupinou byly včely, které slouží jako kontrola bez vpichu. Tyto včely pocházející ze stejných včelstev (číslo 1 a 24) měly stejné stáří jako včely popsané výše (1 den). Tyto včely byly pouze zchlazeny na ledu a bez jakéhokoliv dalšího ošetření byly umístěny do klíček a vloženy do inkubátoru. Po 24 hodinách byly zamraženy.

3.1.1.2 Indukce oxidačního stresu vysokým napadením parazitem

Varroa destructor

K ověření metod sloužily také včely, u kterých byl oxidační stres vyvolán parazitem *Varroa destructor*. Byly to včely pocházející ze včelstev na stanovišti na Kývalce. První z včelstev bylo zdravé, druhé bylo silně napadeno roztočem *Varroa destructor*. Z těchto včelstev byly odebrány plodové rámky, které byly přeneseny do laboratoře. Po vylíhnutí byly mladušky ze zdravého včelstva bez roztoče odebrány a dány do klíček a jsou

považovány za kontrolní zdravé včely. Mladušky z nakaženého včelstva byly rozděleny podle toho, jestli na sobě po vylíhnutí měly roztoče. V případě přítomnosti roztoče jsou tyto včely zařazeny do *Varroa* skupiny včel. Pokud se však vylíhly bez roztoče, jsou nazývány jako kontrolní *Varroa* včely. Mladušky byly následně chovány v klíčkách, a to po dobu 10 dní, kdy měly neomezený přístup jak k pylové, tak i sacharidové potravě. Po 10 dnech byly zamraženy a uchovávány při -80°C. Chov v laboratoři probíhá podle standardního protokolu pro chov včel v klíčkách při *in vitro* laboratorních podmínkách dle (Williams *et al.*, 2013).

3.1.2 Chemikálie

1,1,3,3-tetraethoxypropan (Sigma-Aldrich, Německo)

Acetonitril (J.T. Baker, Nizozemsko)

Butyl-hydroxytoluen (SAFC, Německo)

Ethanol 96% pro UV (Penta, Česká republika)

Chloroform (Merck, Německo)

Kumenhydroperoxid (Acros organics, USA)

Kyselina chlorovodíková (Penta, Česká republika)

Kyselina mravenčí (Sigma-Aldrich, Německo)

Kyselina sírová (Spolana, Česká republika)

Kyselina thiobarbiturová (Sigma-Aldrich, Německo)

Kyselina trichloroctová (Sigma-Aldrich, Německo)

Metanol (J.T. Baker, Nizozemsko)

Síran železnatý heptahydrát (Penta, Česká republika)

Síran železnato-amonný (Lachema, Česká republika)

Thiokyanatan draselný (Lachema, Česká republika)

Triphenylphosphine (Acros organics, USA)

Xylenolová oranž (Acros organics, USA)

3.1.3 Přístrojové vybavení

Analytické váhy (Denver instrument, USA)

Automatické pipety (Eppendorf, Německo)

Digitální předvážky (Radwag, ČR)

Digitální pH metr InoLab pH level 1 (InoLab, Německo)

Elektromagnetická míchačka MS-3000 (Biosan, Litva)

HPLC UltiMate 3000 (Thermo Fisher SCIENTIFIC, USA)

Chlazená centrifuga 5418 R (Eppendorf, Německo)

Kolona YMC-TRIART PHENYL 2 × 150 mm ID, S-3 μ m, 12 nm (YMC.CO, Japonsko)

Mikrocentrifugační filtry NanoSpin PES; 0,2 μ m

Mikrodestičkový spektrofotometr Reader Synergy H1 (BioTek Instruments, USA)

Termoblok CH-100 (Biosan, Litva)

Termostatovaná třepačka PST-100HL (Biosan, Litva)

Vortex V1-Plus (Biosan, Litva)

3.1.4 Činidla

3.1.4.1 FOX2 metoda

- Činidlo A obsahuje 1mM xylenolovou oranž a 2,5mM síran železnato-amonný ve 250mM kyselině sírové. Pro přípravu činidla bylo naváženo 0,076 g xylenolové oranže a 0,066 g (NH₄)FeSO₄ a bylo rozpuštěno ve 100 ml 250mM H₂SO₄, která byla připravena smícháním 1,4 ml H₂SO₄ s 98,6 ml destilované vody.
- Činidlo B obsahuje 4,4mM butylhydroxytoluen v HPLC methanolu. Pro přípravu 500 ml činidla B bylo rozpuštěno 0,485 g BHT v 500 ml MeOH.
- 10mM trifenyfosfin v methanolu. Pro přípravu toho činidla bylo 0,262 g trifenyfosfinu rozpuštěno ve 100 ml MeOH.
- Kumenhydroperoxid (CuOOH) je standardem organických hydroperoxidů. Koncentrace zásobního roztoku je 5360 mmol·l⁻¹. Zásobní roztok byl destilovanou vodou naředěn na 100 μ mol·l⁻¹.

- Extrakční činidlo pro FOX2 je 80% ethanol s 0,01 % butylhydroxytoluenu. Na přípravu 500 ml extrakčního pufru bylo naváženo 0,052 g BHT, a to bylo rozpuštěno ve 400 ml EtOH a 100 ml vody.

3.1.4.2 TBARS metoda

- Činidlo A obsahuje 20 % kyseliny trichloroctové a 0,01 % butylhydroxytoluenu. Na přípravu 200 ml činidla bylo naváženo 88,1 g TCA a 0,02 g BHT a rozpuštěno v 200 ml destilované vody.
- Činidlo B obsahuje také 20 % kyseliny trichloroctové a 0,01 % butylhydroxytoluenu. Navíc však obsahuje 0,65 % thiobarbiturové kyseliny. Na přípravu 200 ml tohoto činidla je potřeba 88,1 g TCA, 0,02 g BHT a 1,3 g TBA, které jsou rozpuštěny ve 200 ml destilované vody.
- 1,1,3,3-tetraethoxypropan (TEP) je standardem MDA. Zásobní roztok má koncentraci $4 \times 10^6 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$; který byl destilovanou vodou 40 000× zředěn na koncentraci $100 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$.
- Extrakčním činidlem je 80% ethanol s 0,01 % butylhydroxytoluenu. Na přípravu 500 ml extrakčního pufru bylo naváženo 0,052 g BHT, a to bylo rozpuštěno ve 400 ml EtOH a 100 ml vody.

3.1.4.3 HPLC

- Mobilní fáze A je 0,5% kyselina mravenčí v HPLC vodě. Na 250 ml mobilní fáze bylo 1,25 ml kyseliny mravenčí smícháno s 248,75 ml vody pro HPLC.
- Mobilní fáze B je acetonitril.
- Obě mobilní fáze byly nejdříve odzdušněny v ultrazvuku.

3.1.4.4 Metoda pro stanovení LPX s použitím thiokyanatanu železitého

- Reagent A je 4,5mM síran železnatý – heptahydrát v 0,2M kyselině chlorovodíkové. Činidlo bylo připraveno smícháním 0,313 g síranu železnatého v 250 ml 0,2M kyseliny chlorovodíkové. Ta byla připravena smícháním 4,5 ml koncentrované HCl a 245 ml destilované vody.
- Reagent B je 3% methanolický roztok thiokyanatanu draselného. Toto činidlo bylo připraveno rozpuštěním 6,12 g KSCN ve 250 ml MeOH.

- Kumenhydroperoxid (CuOOH) je standardem organických hydroperoxidů. Koncentrace zásobního roztoku je $5360 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Zásobní roztok byl ethanolem naředěn na $100 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.
- 20% kyselina trichloroctová pro vysrážení proteinů. Na přípravu 200 ml roztoku bylo 88,1 g TCA bylo rozpuštěno ve 200 ml destilované vody.
- Mix chloroform: methanol 2:1. Bylo smícháno 100 ml chloroformu s 50 ml methanolu. Tato směs byla po dobu 30 minut probublávána dusíkem, aby byla odvzdušněna.

3.2 Metoda FOX2 pro stanovení lipidových peroxidů

3.2.1 Příprava vzorků pro FOX2 stanovení

Vzorky včel byly uchovávány v mrazáku při $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$, po rozmrazení byl pinzetou vytažen trávicí trakt a pro stanovení byl použit pouze zadeček včel, kde se nachází tukové těleso. Zadečky byly následně jednotlivě za pomoci třecí misky s tloučkem a tekutého dusíku zhomogenizovány. Ke každému vzorku bylo přidáno $750 \text{ }\mu\text{l}$ extrakčního činidla (80% ethanol s 0,01% butylhydroxytoluenem (BHT) zabraňujícím autooxidaci). Celý obsah třecích misek byl přenesen do mikrozkušavek, které byly následně centrifugovány při $16000\times g$, při teplotě $5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 10 minut. Supernatant byl přenesen do čisté mikrozkušavky. Takto připravené vzorky byly skladovány na ledu, popřípadě v lednici.

3.2.2 Stanovení kalibrační rovnice pro FOX2 metodu

Pro stanovení kalibrační rovnice byl využit standard lipidových hydroperoxidů kumenhydroperoxid (CuOOH). Rozmezí kalibrační řady bylo $0,5\text{-}20 \text{ nmol}\cdot\text{ml}^{-1}$. Do jamek v 96jankové mikrotitrační destičce bylo pipetováno $20 \text{ }\mu\text{l}$ standardu. Poté bylo do tří jamek přidáno $5 \text{ }\mu\text{l}$ MeOH a do dalších tří $5 \text{ }\mu\text{l}$ $10\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ TPP v MeOH. TPP zde slouží jako redukční činidlo, tudíž je tato sada následně použita jako blank. Následně byla mikrotitrační destička vložena do readru Synergy H1. Po promíchání byla destička inkubována 30 minut při laboratorní teplotě a tmě, kdy došlo k redukci lipidových hydroperoxidů. Po uplynutí této doby bylo přístrojem do každé jamky napipetováno $200 \text{ }\mu\text{l}$ pracovního roztoku FOX2, který se připravuje vždy čerstvý, a to smícháním činidel A a B v poměru 1:9. Po napipetování následovalo promíchání a inkubace (15 min) při laboratorní teplotě. Měření absorbance bylo provedeno v mikrodestičkovém

uspořádání na readru Synergy H1 při vlnové délce 560 nm. Rozdíly naměřených absorbancí vzorků s methanolem a s TPP (3) byly použity pro sestavení kalibrační přímky, kdy na ose x byly koncentrace standardů v $\text{nmol}\cdot\text{ml}^{-1}$. Z kalibrační přímky byla vygenerována kalibrační rovnice (4).

$$A_{LOOH} = A_{s\text{ MeOH}} - A_{s\text{ TPP}} \quad (3)$$

$$y = ax + b \quad (4)$$

3.2.3 Obohacení vzorku o standard CuOOH

Byl připraven směsný vzorek (10 včel bez trávícího traktu, které byly zpracovány výše uvedeným způsobem (3.2.1)), který byl následně napipetován do 96jamkové mikrotitrační destičky. Do jamek v prvních dvou řadách destičky bylo napipetováno 20 μl vzorku a 5 μl MeOH nebo 10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ TPP v MeOH a 5 μl extrakčního činidla (pro zachování stejných objemů). V následujících šesti řadách bylo ke vzorku a MeOH/TPP v MeOH navíc přidáno 5 μl kumenhydroperoxidu o koncentraci 8/32/56 $\text{nmol}\cdot\text{ml}^{-1}$ (konečná koncentrace přidávaného standardu poté byla 2; 8 a 14 $\text{nmol}\cdot\text{ml}^{-1}$). Po 30minutové inkubaci bylo do každé z jamek přidáno 200 μl pracovního roztoku FOX2 a po následující 15minutové inkubaci byla změřena absorbance vzorků v jamkách při 560 nm. Po proměření byly vypočítány rozdíly absorbancí (3) odpovídajících vzorků a koncentrace (5). Poté byl zjištěn rozdíl koncentrací u vzorků se standardem a bez něj (6) a tím byla zpětně stanovena koncentrace přidávaného standardu CuOOH. Hodnoty 2; 8 a 14 $\text{nmol}\cdot\text{ml}^{-1}$ byly považovány za střední hodnoty, ke kterým se měla stanovená hodnota přibližovat.

$$c_{LOOH} = \frac{(A_{LOOH} - a)}{b} \quad (5)$$

$$c_{CuOOH} = c_{s\text{ CuOOH}} - c_{bez\text{ CuOOH}} \quad (6)$$

3.2.4 Spektrofotometrické měření koncentrace LPX metodou FOX2

Do jednotlivých jamek 96jamkové mikrotitrační destičky bylo pipetováno 20 μl vzorku a 5 μl methanolu či redukčního činidla TPP o koncentraci 10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Destička byla vložena do readru Synergy H1, obsah byl promíchán a následovala inkubace (30 min) ve tmě a při laboratorní teplotě. Po uplynutí 30 minut bylo přidáno 200 μl pracovního roztoku FOX2 (činidlo A a B v poměru 1:9). Po napipetování byl obsah opět promíchán

a inkubován (15 minut). Po inkubaci byla změřena absorbance v jamkách při vlnové délce 560 nm. Absorbance vzorků s TPP v methanolu byla odečtena od absorbancí vzorků se samotným methanolem (3). Rozdíly naměřených absorbancí byly následně využity pro vyjádření koncentrace lipidových hydroperoxidů (dosazením do kalibrační rovnice (5)), konkrétně pak v ekvivalentech mikromolární koncentrace kumenhydroperoxidu.

3.3 Metoda TBARS pro stanovení malondialdehydu na readru Synergy H1

3.3.1 Příprava vzorků pro TBARS stanovení

Zadečky včel (bez trávicího traktu) byly homogenizovány v třecí misce s tekutým dusíkem. Poté bylo přidáno 750 μl 80% ethanolu s BHT. Celý obsah třecí misky byl následně přenesen do mikrozkuhavky. Následovala centrifugace při 15000 \times g při 5 °C a to po dobu 10 minut. Po centrifugaci byl supernatant odebrán a přenesen do čistých mikrozkuhovek. Vzorky byly uchovávány na ledu či v mrazáku.

3.3.2 Stanovení kalibrační rovnice pro TBARS

Pro sestavení kalibrační přímky byly připraveny standardy 1,1,3,3-tetraethoxypropanu o koncentraci 0,001-10 $\text{nmol}\cdot\text{ml}^{-1}$. Kalibrační řada byla proměřena v 96jamkových mikrodestičkách. Do jamek bylo pipetováno 100 μl standardu a k tomu bylo přidáno 100 μl činidla. Každý ze standardů byl inkubován jak s činidlem A, tak i B, a vše bylo měřeno v technických triplikátech. Inkubace probíhala na termostatované třepačce při 60 °C po dobu 60 minut. Při inkubaci byla mikrodestička přikryta víčkem. Po inkubaci byla mikrodestička zchlazena na ledové lázni, při čemž bylo víčko odstraněno. Poté byla změřena absorbance při vlnové délce 532 nm.

Následně byla změřena fluorescence vzorků, a to ve speciálních 96jamkových destičkách uzpůsobených pro měření fluorescence. Excitační vlnová délka byla 525 nm a vlnová délka emise byla 560 nm.

Z naměřených hodnot a koncentrací daných standardů byly sestaveny kalibrační přímky a jimi dané kalibrační rovnice (4).

3.3.3 Obohacení vzorku o standard TEP a jeho zpětné stanovení ze vzorku

Deset experimentálních včel bylo zpracováno výše uvedeným způsobem (viz. 3.3.1), a byly smíchány do jednoho směsného vzorku. 50 μl tohoto směsného vzorku bylo napipetováno do každé z jamek, spolu s 50 μl ethanolu a 100 μl příslušných činidel A a B. Následně byl připraven standard TEP o koncentracích 40, 80 a 120 $\text{nmol}\cdot\text{ml}^{-1}$, který byl přidáván ke vzorkům. Do dalšího řádku bylo následně pipetováno 50 μl vzorku, 45 μl 80% ethanolu a 5 μl připraveného standardu o koncentraci 40/80/120 $\text{nmol}\cdot\text{ml}^{-1}$. Poté bylo přidáno 100 μl činidla B a po promíchání proběhla hodinová inkubace při 60 °C. Následovalo ochlazení na laboratorní teplotu a změření absorbance při 532 nm.

Stejný postup byl zopakován s použitím 96jamkové mikrodestičky určené pro měření fluorescence (černé). Fluorescence byla měřena při excitaci při 525 nm a emisi 560 nm.

Dosazením do příslušných kalibračních rovnic byly vypočítány koncentrace MDA ve vzorcích. Rozdíl koncentrací pak odpovídal zpětně stanovenému standardu TEP, který byl přidán. Objem přidaného standardu byl takový, aby jeho konečná koncentrace ve vzorku odpovídala 2, 4 a 6 $\text{nmol}\cdot\text{ml}^{-1}$. Tato hodnota pak byla považována za střední hodnotu, ke které se měla stanovená hodnota přibližovat.

3.3.4 Spektrofotometrické stanovení lipidické peroxidace metodou

TBARS

Koncentrace malondialdehydu byla stanovena optimalizovaným protokolem. Měření probíhalo v 96jamkových destičkách a každý vzorek byl měřen v triplicátech. Do kontrolních jamek bylo pipetováno 100 μl destilované vody a 100 μl činidla A či B. Do následujících jamek bylo pipetováno 50 μl vzorku včel, 50 μl 80% ethanolu a dále 100 μl činidla A nebo B. Po napipetování byl obsah mikrodestičky promíchán, následně byla destička přikryta víčkem a zajištěna parafilmem. Po hodinové inkubaci při 60 °C, která probíhala na termostatované třepačce, byla mikrodestička ponechána na ledové lázni. Po ochlazení následovalo změření absorbance při 532 nm na readru Synergy H1.

Vzorky byly následně pomocí multikanálové pipety přepipetovány do 96jamkové mikrodestičky určené pro měření fluorescence. V ní byla následně změřena fluorescence taktéž na readru Synergy H1, a to při excitační vlnové délce 525 nm a emisní

vlnové délce 560 nm. Naměřené hodnoty byly následně dosazeny do příslušných kalibračních rovnic, čímž byly zjištěny koncentrace MDA ve vzorcích.

3.4 HPLC separace, detekce a kvantifikace TBARS produktu

3.4.1 Příprava vzorků

Včely bez trávicího traktu byly homogenizovány v třecí misce s tekutým dusíkem. Poté bylo přidáno 750 μl 80% ethanolu s BHT. Celý obsah třecí misky byl následně přenesen do mikrozkušavky. Následovala centrifugace při 15000 \times g při 5 $^{\circ}\text{C}$ a to po dobu 10 minut. Po centrifugaci bylo 250 μl supernatantu přeneseno do čisté mikrozkušavky. K supernatantu bylo přidáno 250 μl ethanolu a 500 μl činidla B. Po promíchání byly vzorky inkubovány na termobloku, a to po dobu 60 minut při 60 $^{\circ}\text{C}$. Po uplynutí doby inkubace byly vzorky ochlazeny na ledu. Následně bylo do mikrocentrifugačních filtrů NanoSpin PES s póry o velikosti 0,2 μm přeneseno 150 μl vzorku. Ty byly následně stočeny v centrifuze, a to při 15000 \times g při 5 $^{\circ}\text{C}$ a to po dobu 5 minut. Přefiltrovaný vzorek byl přenesen do vialek. Pokud se vzorky nebylo pracováno hned, byly uchovávány v lednici, nikoli v mrazáku.

3.4.2 Kalibrační řada

Byla připravena kalibrační řada za použití standardu 1,1,3,3-tetraethoxypropanu, který byl naředěn na koncentrace v rozmezí 0,001-10 $\text{nmol}\cdot\text{ml}^{-1}$. K 250 μl standardu bylo přidáno 250 μl činidla B. Následovala 60minutová inkubace na termobloku při 60 $^{\circ}\text{C}$. Po ochlazení bylo odebráno 150 μl , které byly přeneseny do mikrocentrifugačních filtrů. Následovala centrifugace při 15000 \times g při 5 $^{\circ}\text{C}$ a to po dobu 5 minut. Přefiltrované standardy byly přepipetovány do vialek.

3.4.3 HPLC analýza

Pro stanovení MDA-TBA₂ produktu byla použita metoda HPLC s FLD detekcí. Délka analýzy byla 4 minuty, přičemž retenční čas požadovaného produktu odpovídal 3. minutě. Mobilní fáze A byla 0,5% kyselina mravenčí v HPLC vodě a mobilní fáze B byl acetonitril. Analyty byly separovány na koloně YMC-TRIART PHENYL (2 \times 150 mm ID, S-3 μm , 12 nm). Pro separaci byla vybrána gradientová eluce, kdy do 1. minuty byl obsah organické fáze (mobilní fáze B) 5 %. Od 1. do 3. minuty obsah B

stoupal na 35 %. Do 3,5 minuty byl obsah B fáze konstantní, poté během 0,1 minuty se snížil podíl B fáze zpět na 5 %, což bylo po zbytek analýzy až do 4. minuty. Gradient je ukázán na obrázku níže (Obr.11). Průtok mobilní fáze byl vzhledem k parametrům použité kolony $0,200 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ a bylo nastříkovááno $5 \mu\text{l}$ vzorku či standardu. Separace na koloně probíhala při teplotě $35 \text{ }^\circ\text{C}$.

Detekce probíhala pomocí fluorescenčního detektoru. Excitace při měření fluorescence probíhá při 525 nm a emise je detekována při 560 nm . Programem Chromeleon 7 byla následně integrována plocha píků a metodou externí kalibrace poté byla zjištěna koncentrace MDA.



Obr. 11 Gradient mobilní fáze pro analýzu

3.5 Stanovení lipidových hydroperoxidů metodou s thiokyanatanem železitým

Tato spektrofotometrická metoda je založena na oxidaci železnatých iontů na železité, a to pomocí lipidových hydroperoxidů. Železité ionty následně tvoří komplex s thiokyanatanovými ionty. Optimalizovaný postup vycházel z protokolu (Galluzzi *et al.*, 2013).

3.5.1 Příprava vzorků

U vzorků včel byl po rozmražení pinzetou vytažen trávicí trakt a pro stanovení byl použit pouze zadeček včel. Každý zadeček byl následně jednotlivě v tekutém dusíku a za pomoci třecí misky s tloučkem zhomogenizován na prach. Ke každému vzorku bylo přidáno 750 μl vody pro HPLC. Celý obsah třecích misek byl přenesen do mikrozkuumavek, které byly následně centrifugovány při 16000 \times g, při teplotě 5 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 10 minut. 500 μl supernatantu bylo přeneseno do čisté mikrozkuumavky. K supernatantu bylo přidáno 500 μl 20% kyseliny trichloroctové a 1000 μl vychlazeného chloroformu. Mikrozkuumavky byly vortexovány a následně centrifugovány, a to po dobu 5 minut při 3000 \times g a při 5 $^{\circ}\text{C}$. Po centrifugaci byla odebrána spodní chloroformová vrstva, která byla přenesena do čisté mikrozkuumavky. Takto připravené vzorky byly skladovány na ledu, popřípadě v lednici.

3.5.2 Kalibrační řada

Pro stanovení kalibrační rovnice byl využit standard lipidových hydroperoxidů kumenhydroperoxid (CuOOH) v ethanolu. Rozmezí kalibrační řady bylo 0,5-20 $\text{nmol}\cdot\text{ml}^{-1}$. Blankem je mix chloroformu a methanolu. Byl připraven 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ethanolický roztok, který byl použit pro přípravu kalibrační řady. Množství standardu bylo poté doplněno mixem chloroformu s methanolem na objem 950 μl . Poté bylo přidáno 50 μl chromogenu, který byl připraven smícháním činidla A a B v poměru 1:1. Po promíchání proběhla 20minutová inkubace ve tmě. Po inkubaci byla ve skleněných kyvetách změřena absorbance při 500 nm. Z naměřených absorbancí a koncentrací standardů byla sestavena kalibrační přímka a vygenerována kalibrační rovnice.

3.5.3 Stanovení lipidových hydroperoxidů ve vzorcích včel

V mikrozkuhavce bylo smícháno 500 μ l chloroformového extraktu se 450 μ l mixu chloroform: methanol. Poté bylo přidáno 50 μ l chromogenu, který byl připraven smícháním činidel A a B v poměru 1:1. Po promíchání proběhla 20minutová inkubace za pokojové teploty a ve tmě. Po uplynutí 20 minut byla změřena absorbance při 500 nm, a to proti blanku (chloroform: methanol mix s chromogenem). Dosazením do rovnice kalibrační přímky byla dopočítána koncentrace lipidových hydroperoxidů ve vzorku.

3.6 Statistické vyhodnocení

Pro základní zpracování dat byl použit Microsoft Excel 2010. Pro znázornění výsledků byly použity grafy, které byly vytvořeny v programu Statistica 13.4.0. V tomtéž programu byla data statisticky vyhodnocena. Bylo testováno normální rozdělení dat, následně pak byla testována statistická významnost metodou ANOVA s post-hoc Bonferroniho testem. Statistická významnost použitých t-testů byla hodnocena na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Pro porovnání fluorescenčního stanovení dvěma přístroji byl použit párový t-test.

4 VÝSLEDKY

4.1 Metoda FOX2

4.1.1 Vývoj metodiky

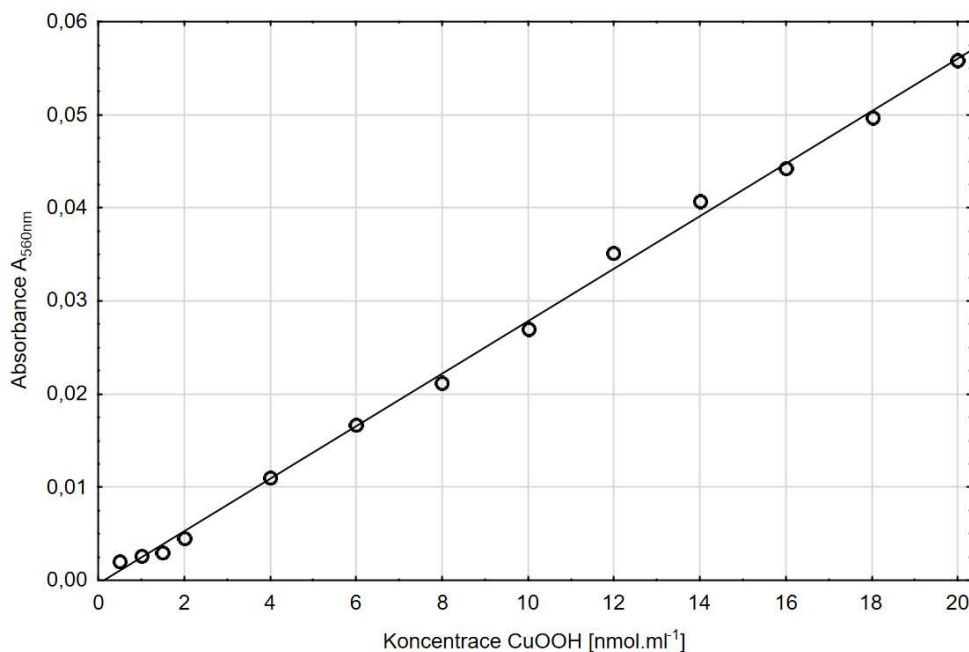
Postup měření této metody byl popsán v dříve publikovaném článku (Nouroozzadeh *et al.*, 1994). Postup měření i příprava vzorku byly však optimalizovány. Příprava vzorku, samotná homogenizace a extrakce (dle (DeLong *et al.*, 2002)), byla nastavena tak, aby stejné vzorky mohly být použity i pro měření další z uvedených metod – metody TBARS. Tím pádem mohou být připravené vzorky použity jak pro metodu FOX2, tak i pro metodu TBARS, což šetří čas i biologický materiál, a získáváme tak komplexnější výsledky.

Dále muselo být změněno pořadí pipetování komponentů, protože methanol či methanolický roztok TPP se velmi rychle odpařuje, proto je nutné jej přidávat k již napipetovanému vzorku či standardu. Nedojde tak k jeho odpaření a zkreslení výsledků měření. Dalším z optimalizovaných parametrů byla také doba inkubace. Různé protokoly se rozcházel v délkách inkubací, některé uváděly 15 minut a jiné 30 minut. Byla přichystána kalibrační řada, která byla proměřena ve dvou 96 jamkových destičkách. Destička A měla první inkubaci 15 minut a destička B byla při prvním kroku inkubována po dobu 30 minut. Po přidání činidla byly obě destičky inkubovány 15 minut, poté byla proměřena absorbance. Po proměření byly destičky inkubovány dalších 15 minut a poté opět proměřeny. Byly vytvořeny čtyři kalibrační přímky a z nich byly vygenerovány kalibrační rovnice. Stejným způsobem byly proměřeny i vzorky včel. Absorbance z těchto čtyř měření byly dosazeny do příslušných kalibračních rovnic a byly dopočítány koncentrace lipidových hydroperoxidů ve vzorcích. Z takto získaných dat bylo vyvozeno, že optimální je možnost ta, kdy první inkubace (kdy dochází k redukci hydroperoxidů pomocí TPP) trvá 30 minut a druhá inkubace (vyvíjení zbarvení) 15 minut. V případě, kdy byla první inkubace 15 minut, nedošlo k úplnému zredukování lipidových hydroperoxidů, tím pádem nemohla být přesně stanovena koncentrace. Naopak prodloužení druhé inkubace na 30 minut nezpůsobilo žádnou změnu. Byla také ověřena opakovatelnost měření, kdy výše optimalizovaným způsobem byly 4x v průběhu jednoho dne změřeny stejné vzorky. Koncentrace se zde lišila jen minimálně, což bylo způsobeno chybou v pipetování.

Byly stanoveny hodnoty limitu detekce a kvantifikace, kdy limit detekce se rovná trojnásobku šumu a limit kvantifikace je desetinásobek šumu. Dosazením do kalibrační rovnice byl limit detekce stanoven na koncentraci $1,07 \text{ nmol}\cdot\text{ml}^{-1}$. Limit kvantifikace byl poté stanoven na koncentraci $2,46 \text{ nmol}\cdot\text{ml}^{-1}$.

4.1.2 Kalibrační přímka

Po optimalizaci byly opět připraveny roztoky kalibrační řady standardu kumenhydroperoxidu o koncentraci $0,5\text{-}20 \text{ nmol}\cdot\text{ml}^{-1}$. Po inkubacích byly proměřeny absorbance a po odečtení blanku (vzorky s TPP) byla z rozdílů absorbancí a koncentrací standardů sestavena kalibrační přímka a byla vygenerována kalibrační rovnice. Tato kalibrační přímka je zobrazena níže (Obr. 12). Rovnice přímky je ve tvaru $y = 0,0028x - 0,0004$ a hodnota spolehlivosti R^2 je $0,9978$.



Obr. 12 Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace lipidových hydroperoxidů za pomoci standardu kumenhydroperoxidu s rozmezím $0,5\text{-}20 \text{ nmol}\cdot\text{ml}^{-1}$. Rovnice přímky pro přepočítání koncentrace je ve tvaru $y = 0,0028x - 0,0004$; $R^2 = 0,9978$

4.1.3 Zpětné stanovení standardu kumenhydroperoxidu (CuOOH)

O správnosti stanovení vypovídá také experiment se zpětným stanovením přidaného standardu ke vzorku včel, kdy byla opět použita 96jamková destička. Postup je popsán v kapitole 3.2.4. Po změření absorbancí byly vypočítány koncentrace lipidových hydroperoxidů v jamkách a po jejich vzájemném odečtení (rovnice 6) byl zpětně stanoven přidaný standard. Zjištěné koncentrace, jejich rozdíl a jejich systematická odchylka (tzv. BIAS) jsou uvedeny v Tab. 2. Ke vzorkům byly přidávány standardy o třech různých koncentracích (ze začátku, středu i konce kalibrační řady), aby se zároveň ověřilo, ve které části kalibrační řady je stanovení nejpřesnější. Systematická odchylka ukázala, že nejpřesnější stanovení je právě ve střední části kalibrační řady, kdy po přidavku 8 μ M CuOOH, byla odchylka po zpětném stanovení nejnižší, a to -6,7 %. Naopak při přidavku 14 μ M CuOOH byla chyba stanovení téměř dvojnásobná (-12 %).

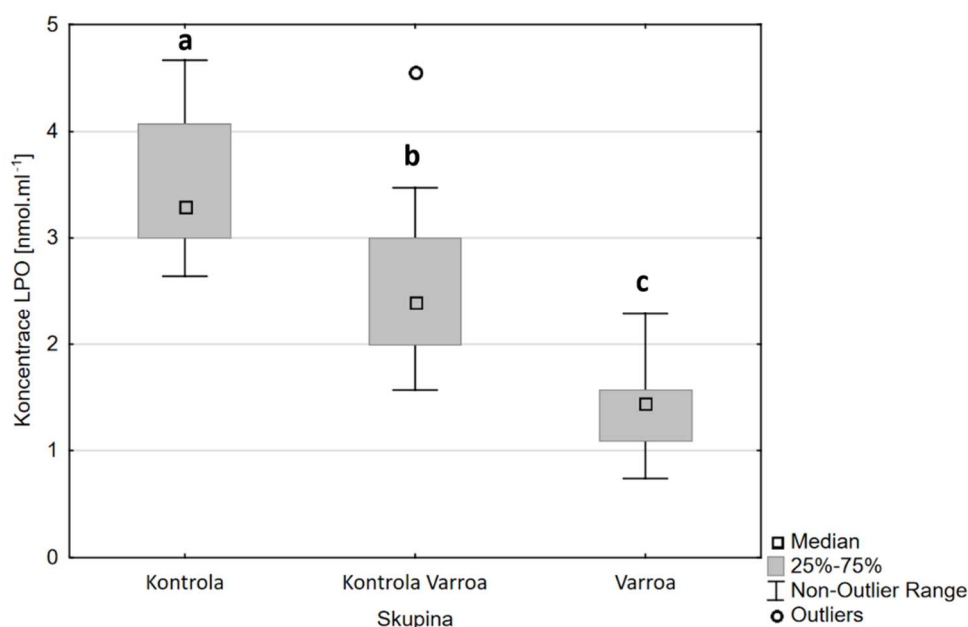
Tab. 2 Koncentrace lipidových hydroperoxidů před a po přidavku standardu CuOOH o třech různých koncentracích. Rozdíl koncentrací po a před přidavkem standardu a BIAS, neboli systematická odchylka.

Vzorek	Koncentrace LOOH před	Koncentrace LOOH po	Rozdíl	BIAS	Koncentrace LOOH po	Rozdíl	BIAS	Koncentrace LOOH po	Rozdíl	BIAS
	přidavkem CuOOH	přidavku 2 μ M CuOOH			přidavku 8 μ M CuOOH			přidavku 14 μ M CuOOH		
	[nmol·ml ⁻¹]	[nmol·ml ⁻¹]			[nmol·ml ⁻¹]			[nmol·ml ⁻¹]		
1	3,108	5,811	2,703	0,703	11,486	8,378	0,378	17,162	14,054	0,054
2	4,189	5,541	1,351	-0,649	11,486	7,297	-0,703	16,622	12,432	-1,568
3	4,459	6,622	2,162	0,162	11,757	7,297	-0,703	17,162	12,703	-1,297
4	4,730	6,351	1,622	-0,378	12,027	7,297	-0,703	16,081	11,351	-2,649
5	4,189	6,351	2,162	0,162	11,757	7,568	-0,432	16,351	12,162	-1,838
6	4,459	6,081	1,622	-0,378	11,486	7,027	-0,973	16,351	11,892	-2,108
7	4,730	5,811	1,081	-0,919	11,757	7,027	-0,973	16,622	11,892	-2,108
8	4,459	5,811	1,351	-0,649	11,757	7,297	-0,703	16,081	11,622	-2,378
9	3,919	5,811	1,892	-0,108	11,486	7,568	-0,432	16,892	12,973	-1,027
10	3,378	5,270	1,892	-0,108	11,216	7,838	-0,162	15,811	12,432	-1,568
průměr	4,162	5,946	1,784	-0,216	11,622	7,459	-0,541	16,514	12,351	-1,649
%				-10,811			-6,757			-11,776

4.1.4 Měření vzorků včel

4.1.4.1 Měření vzorků *Varroa* včel

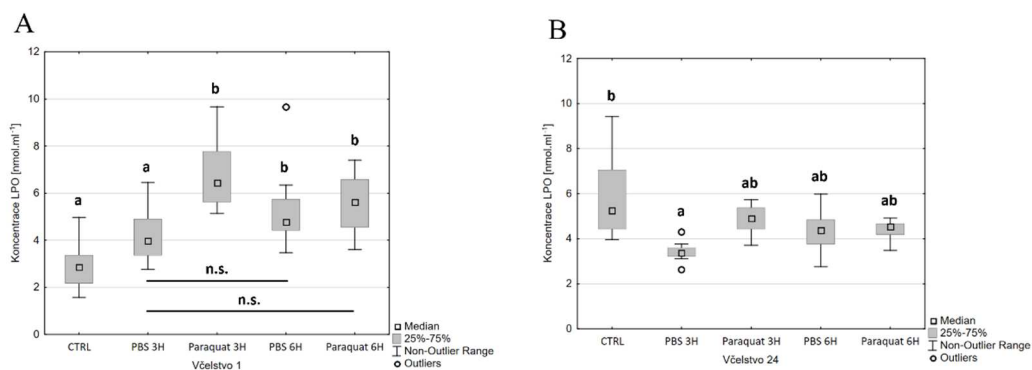
Optimalizovanou metodou FOX2 byla stanovována lipidická peroxidace u včel. Byly využity zadečky včel. Graf na Obr. 13 ukazuje koncentrace lipidových hydroperoxidů u včel, u kterých byl oxidační stres vyvolán parazitem *Varroa destructor*. Včely v kontrolní skupině obsahují největší množství lipidových hydroperoxidů. Koncentrace LOOH se u těchto 10 vzorků pohybovala v rozmezí 3-4 nmol·ml⁻¹. Skupina kontrola *Varroa* obsahovala zdravé včely pocházející ze včelstva napadeného roztočem *Varroa*. Tyto včely měly v porovnání s kontrolními včelami nižší koncentraci lipidových hydroperoxidů. Koncentrace lipidových hydroperoxidů se zde pohybovala od 2 do 3 nmol·ml⁻¹. Nejméně těchto molekul bylo stanoveno ve včelách, na kterých roztoč *Varroa destructor* parazitoval. U těchto včel byla hladina LOOH prokazatelně nejnižší, koncentrace se pohybovala mezi 1-1,5 nmol·ml⁻¹. V tomto případě s rostoucí mírou oxidačního stresu koncentrace lipidových hydroperoxidů klesá. Všechny tři výše uvedené skupiny včel byly vzájemně signifikantně odlišné. Výsledky byly testovány na hladině významnosti $p < 0,05$.



Obr. 13 Koncentrace lipidových hydroperoxidů v zadečcích včel s varroázou, kdy $n=10$ pro každou skupinu. Koncentrace je uvedena v jednotkách [nmol·ml⁻¹]. 1-way ANOVA $F(2,27)= 20,543$; $p= 0,000$. Rozdílná písmena nad grafy ukazují, že jsou výsledky signifikantně odlišné, a to na základě Bonferroniho post-hoc testu.

4.1.4.2 Měření vzorků včel ošetřených paraquatem

Grafy na Obr. 14 A, B zobrazují výsledky z měření koncentrace lipidových hydroperoxidů u včel s laboratorně vyvolaným oxidačním stresem. Obr. 14. A zobrazuje výsledky z měření včel pocházejících z včelstva číslo 1, zatímco v Obr. 14 B jsou zobrazeny koncentrace u včel ze včelstva číslo 24. Každá skupina čítá 10 vzorků a byly použity pouze zadečky včel bez trávicího traktu. U včelstva číslo 1 lze vidět vzestupný trend, kdy se vzrůstající mírou stresu, kterému byly včely vystaveny, se zvyšuje také koncentrace lipidových hydroperoxidů. Koncentrace LOOH u kontrolní skupiny včel se pohybovala okolo $3 \text{ nmol}\cdot\text{ml}^{-1}$. U včel, které byly injektovány roztokem PBS (pro kontrolu mechanického stresu) je vidět nárůst koncentrace oproti kontrole. Zároveň je v tomto případě vidět nárůst koncentrace v čase, kdy po 3 hodinách od aplikace je průměrná koncentrace LOOH $4 \text{ nmol}\cdot\text{ml}^{-1}$, tak po 6 hodinách od aplikace je koncentrace LOOH v zadečcích včel přibližně $5 \text{ nmol}\cdot\text{ml}^{-1}$. U včel injektovaných roztokem paraquatu je nárůst koncentrace LOOH více než dvojnásobný, kdy po 3 hodinách od injekce byla stanovena koncentrace nad $6,5 \text{ nmol}\cdot\text{ml}^{-1}$. Po 6 hodinách byla koncentrace LOOH podobná, pohybovala se okolo $6 \text{ nmol}\cdot\text{ml}^{-1}$. Statistické vyhodnocení ukázalo, že skupiny PBS po 6 hodinách, paraquat po 3 a 6 hodinách jsou signifikantně odlišné od kontrolní skupiny. PBS a paraquat po 3 hodinách od podání jsou vzájemně odlišné. U včelstva číslo 24 nejsou rozdíly tak výrazné. Koncentrace zkoumaných látek u včel v kontrolní skupině je velmi rozdílná, pohybovala se od 4 do $7 \text{ nmol}\cdot\text{ml}^{-1}$. U ošetření PBS i paraquatem je následně vidět stejný trend jako u včelstva číslo 1, i když rozdíly nejsou tak patrné. Koncentrace LOOH po 3 hodinách od ošetření PBS roztokem se pohybovala okolo $3,5 \text{ nmol}\cdot\text{ml}^{-1}$, zatímco po 6 hodinách byla stanovená koncentrace $4,5 \text{ nmol}\cdot\text{ml}^{-1}$. Po 3 hodinách od aplikace roztoku paraquatu se koncentrace LOOH u včel pohybovala okolo $5 \text{ nmol}\cdot\text{ml}^{-1}$, zatímco po 6 hodinách koncentrace opět klesla na $4,5 \text{ nmol}\cdot\text{ml}^{-1}$. ANOVA s Bonferroniho post-hoc testem ukázala, že vzájemně odlišné jsou pouze skupiny kontrola a PBS po 3 hodinách. Zbylé skupiny nebyly vzájemně signifikantně odlišné. Trend je tedy v obou případech podobný, avšak koncentrace jsou u včelstva 24 nižší, nežli u včel z včelstva číslo 1.



Obr. 14 A) koncentrace lipidových hydroperoxidů u včel ze včelstva číslo 1, kdy $n=10$ a koncentrace je uvedena v $[\text{nmol}\cdot\text{ml}^{-1}]$. 1-way ANOVA $F(4, 45)= 11,845$; $p= 0,000$. B) koncentrace lipidových hydroperoxidů u včel ze včelstva číslo 24, kdy $n=10$. 1-way ANOVA $F(4, 39)= 6,271$; $p= 0,001$. Rozdílná písmena nad grafy ukazují, že jsou výsledky signifikantně odlišné, a to na základě Bonferroniho post-hoc testu. Stejná písmena, popřípadě značka n.s. znamená, že skupiny nejsou signifikantně odlišné.

Koncentrace lipidových hydroperoxidů ve vzorcích včel se pohybuje v rozmezí $2-8 \text{ nmol}\cdot\text{ml}^{-1}$, a to v závislosti na druhu vzorku a stresu, kterému byly včely vystaveny. V případě vyvolání oxidačního stresu látkou paraquat se očekává nárůst koncentrace LOOH s časem, a naopak včely nakažené varoázou mají nižší koncentrace LOOH nežli zdravé včely. Proto byla kalibrační přímka zvolena v širším rozmezí.

4.2 Metoda TBARS

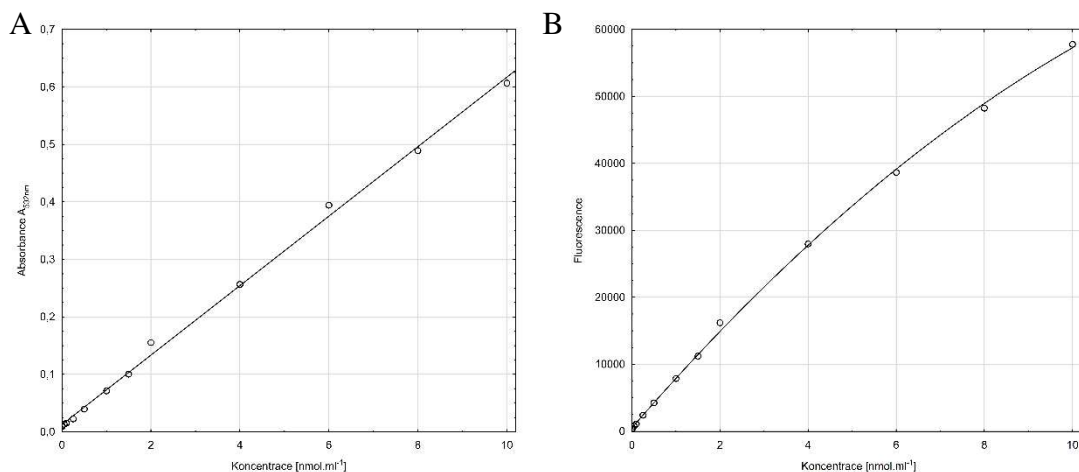
4.2.1 Optimalizace stanovení na spektrofotometru

Již v rámci bakalářské práce (Pindřáková, 2019) bylo optimalizováno stanovení malondialdehydu jako koncového produktu lipidické peroxidace, a to konkrétně pomocí UV-VIS detekce, u které však hrozí řada interferencí. Bylo optimalizováno hned několik parametrů, jako například příprava vzorku a následné inkubace. Nyní v rámci diplomové práce bylo optimalizováno stanovení MDA s fluorescenční detekcí, u které se předpokládá větší specifita a citlivost. Postup přípravy vzorku i samotné složení reakce bylo ponecháno stejné jako u UV-VIS detekce, se kterou bylo fluorescenční stanovení srovnáváno. Jedním z optimalizovaných parametrů u fluorescenčního stanovení byl gain. Bylo pracováno s několika možnostmi (50; 70; 80; 100), avšak vzhledem k rozsahu kalibrační řady byl nastaven optimální gain na hodnotu 80, která byla použita pro všechna měření. Byla ověřena opakovatelnost stanovení, kdy vzorky byly během jednoho dne opakovaně (3krát) proměřeny.

Jak pro UV-VIS stanovení, tak i fluorescenční stanovení byly vypočítány limity detekce a kvantifikace, kdy limit detekce byl opět vypočítán jako trojnásobek šumu a limit kvantifikace jako desetinásobek šumu. Pro UV-VIS stanovení je limitem detekce koncentrace malondialdehydu $0,024 \text{ nmol}\cdot\text{ml}^{-1}$, zatímco limit kvantifikace se rovná koncentraci $0,056 \text{ nmol}\cdot\text{ml}^{-1}$. U fluorescenční detekce bylo ověřeno, že je stanovení mnohem citlivější, jelikož naměřené fluorescence a následně vypočítané rozdíly byly nižší, než-li jsou hodnoty pro nejnižší bod kalibrační řady, což byl standard o koncentraci $0,001 \text{ nmol}\cdot\text{ml}^{-1}$. Limity detekce a kvantifikace jsou tedy pod touto hodnotou.

4.2.2 Kalibrační přímka pro metodu TBARS

Byla připravena kalibrační řada standardu TEP v rozsahu od $0,001$ do $10 \text{ nmol}\cdot\text{ml}^{-1}$ a po inkubaci byla proměřena jak absorbance, tak i fluorescence standardů. Následně byly sestaveny kalibrační křivky a byly vygenerovány kalibrační rovnice. Obr. 15 A zobrazuje kalibrační přímku pro UV-VIS stanovení, kdy proti koncentracím standardů jsou uvedeny příslušné absorbance. Zde je závislost lineární a kalibrační rovnice pro přepočet koncentrace je ve tvaru $y = 0,0604x + 0,0128$; hodnota spolehlivosti je $0,9978$. Obr. 15 B ukazuje kalibrační křivku pro fluorescenci. Polynomická regrese je zde vyjádřena jako $y = -190,48x^2 + 7578,5x + 504,41$; a hodnota spolehlivosti je $0,9994$.



Obr. 15 Kalibrační křivky pro stanovení koncentrace malondialdehydu, s koncentračním rozmezím $0,001$ - $10 \text{ nmol}\cdot\text{ml}^{-1}$. A) z UV-VIS detekce při 532 nm , rovnice přímky $y = 0,0604x + 0,0128$; $R^2 = 0,9978$; B) při fluorescenční detekci, excitace při 525 nm , emise při 560 nm , regrese křivky $y = -190,48x^2 + 7578,5x + 504,41$; $R^2 = 0,9994$.

4.2.3 Zpětné stanovení standardu tetraethoxypropanu (TEP)

Správnost metody byla ověřena zpětnou kvantifikací přidaného standardu ze vzorku. Do 96jamkových destiček (jedna pro měření absorbance a druhá pro fluorescenční stanovení) byly napipetovány vzorky a k části byl přidán standard. Postup je popsán v kapitole 3.3.4. Po proměření absorbance a fluorescence u všech vzorků byly pomocí kalibračních rovnic dopočítány koncentrace MDA ve vzorcích. V tabulkách níže jsou uvedeny stanovené koncentrace, jejich rozdíl a tzv. BIAS (systematická odchylka). Stejně jako u metody FOX2 byl použit standard o třech různých koncentracích, a to 2; 4 a 6 nmol·ml⁻¹. Tab. 3 zobrazuje výsledky z UV-VIS stanovení. Průměrně byla koncentrace MDA ve vzorcích včel před přidavkem TEP 0,238 nmol·ml⁻¹. Po přidavku 2μM standardu byla průměrná koncentrace MDA ve vzorku 2,750 nmol·ml⁻¹; systematická odchylka pro toto stanovení je 25,6 %, což je v rámci tohoto experimentu chyba nejvyšší. Při přidavku 4μM standardu byl BIAS stanoven na 18 %, kdy průměrná koncentrace po přidavku standardu byla 5 nmol·ml⁻¹. Po přidavku 6μM standardu byla průměrná koncentrace MDA ve vzorku 7,6 nmol·ml⁻¹. Systematická odchylka je zde 23 %. Tab. 4 poté obsahuje naměřené a vypočítané hodnoty získané z fluorescenční detekce. Před přidavkem TEP ke vzorkům včel byla koncentrace malondialdehydu v nich průměrně 0,217 nmol·ml⁻¹. Po přidavku 2μM standardu bylo průměrně stanoveno pouze 1,914 nmol·ml⁻¹. Chyba stanovení byla v tomto případě -15 %. Po přidavku 4μM bylo zpětně stanoveno pouze 3,68 nmol·ml⁻¹, kdy se BIAS rovná -13,5 %. Nejmenší systematická odchylka byla stanovena po přidavku 6μM standardu, kdy naměřená koncentrace byla přibližně 6,5 nmol·ml⁻¹. Tento experiment ukázal správnost stanovení, a to při různých koncentracích. Mimo jiné bylo prokázáno, že fluorescenční stanovení je přesnější, citlivější a spolehlivější nežli UV-VIS detekce, kde mohou interferovat různé látky.

Tab. 3 Koncentrace malondialdehydu stanovená UV-VIS detekcí pomocí mikrodestičkového readru. V tabulce jsou koncentrace před a po přidavku standardu TEP o třech různých koncentracích. Rozdíl koncentrací po a před přidavkem standardu a BIAS, neboli systematická odchylka.

Vzorek	Koncentrace MDA před přidavkem TEP	Koncentrace MDA po přidavku 2 μ M TEP			Koncentrace MDA po přidavku 4 μ M TEP			Koncentrace MDA po přidavku 6 μ M TEP		
	[nmol·ml ⁻¹]	[nmol·ml ⁻¹]	Rozdíl	BIAS	[nmol·ml ⁻¹]	Rozdíl	BIAS	[nmol·ml ⁻¹]	Rozdíl	BIAS
1	0,205	2,288	2,083	0,083	4,772	4,566	0,566	7,470	7,265	1,265
2	0,073	2,917	2,844	0,844	4,954	4,881	0,881	7,387	7,315	1,315
3	0,073	2,917	2,844	0,844	5,152	5,079	1,079	7,619	7,546	1,546
4	0,934	3,116	2,182	0,182	5,285	4,351	0,351	7,917	6,983	0,983
5	0,106	2,834	2,728	0,728	5,136	5,030	1,030	7,834	7,728	1,728
6	0,272	2,619	2,348	0,348	4,821	4,550	0,550	8,182	7,911	1,911
7	0,272	2,785	2,513	0,513	4,904	4,632	0,632	7,205	6,934	0,934
8	0,073	2,487	2,414	0,414	4,573	4,500	0,500	7,437	7,364	1,364
9	0,205	2,603	2,397	0,397	4,954	4,748	0,748	7,570	7,364	1,364
10	0,172	2,934	2,762	0,762	5,119	4,947	0,947	7,437	7,265	1,265
průměr	0,238	2,750	2,512	0,512	4,967	4,728	0,728	7,606	7,368	1,368
%				25,579			18,212			22,792

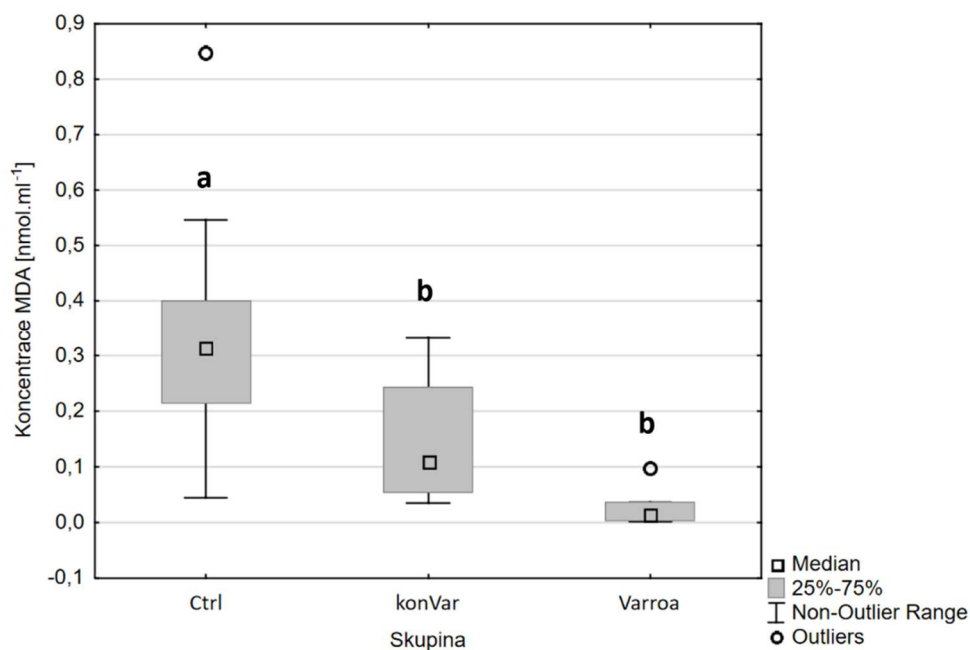
Tab. 4 Koncentrace malondialdehydu stanovená fluorescenční detekcí pomocí mikrodestičkového readru. V tabulce jsou koncentrace před a po přidavku standardu TEP o třech různých koncentracích. Rozdíl koncentrací po a před přidavkem standardu a BIAS, neboli systematická odchylka.

Vzorek	Koncentrace MDA před přidavkem TEP	Koncentrace MDA po přidavku 2 μ M TEP			Koncentrace MDA po přidavku 4 μ M TEP			Koncentrace MDA po přidavku 6 μ M TEP		
	[nmol·ml ⁻¹]	[nmol·ml ⁻¹]	Rozdíl	BIAS	[nmol·ml ⁻¹]	Rozdíl	BIAS	[nmol·ml ⁻¹]	Rozdíl	BIAS
1	0,272	2,221	1,950	-0,050	3,491	3,219	-0,781	7,292	7,021	1,021
2	0,230	2,023	1,793	-0,207	3,332	3,102	-0,898	6,444	6,214	0,214
3	0,207	1,977	1,770	-0,230	3,479	3,272	-0,728	6,388	6,181	0,181
4	0,225	1,980	1,754	-0,246	3,314	3,089	-0,911	6,009	5,784	-0,216
5	0,213	1,850	1,636	-0,364	3,455	3,242	-0,758	6,192	5,979	-0,021
6	0,184	1,854	1,670	-0,330	3,667	3,483	-0,517	5,944	5,760	-0,240
7	0,187	1,769	1,582	-0,418	3,674	3,487	-0,513	5,741	5,554	-0,446
8	0,155	1,490	1,336	-0,664	3,960	3,805	-0,195	7,194	7,040	1,040
9	0,189	1,710	1,521	-0,479	4,063	3,874	-0,126	6,884	6,695	0,695
10	0,307	2,264	1,957	-0,043	4,362	4,055	0,055	6,917	6,610	0,610
průměr	0,217	1,914	1,697	-0,303	3,680	3,463	-0,537	6,500	6,284	0,284
%				-15,159			-13,430			4,727

4.2.4 Měření vzorků včel

4.2.4.1 Měření vzorků *Varroa* včel

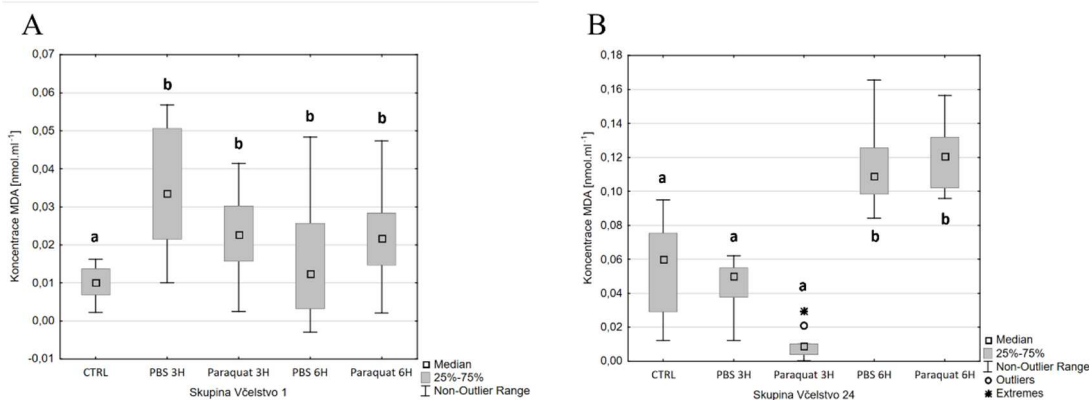
Metodou TBARS byly následně měřeny koncentrace malondialdehydu ve vzorcích včel, u kterých byl oxidační stres vyvolán roztočem *Varroa destructor*. Obr. 16 ukazuje graf koncentrace MDA v jednotlivých skupinách. U včel z kontrolní skupiny se koncentrace MDA pohybovala v rozmezí od 0,2 do 0,4 nmol·ml⁻¹. U zdravých včel pocházejících ze včelstva nakaženého varoázou byla zjištěna nižší koncentrace markeru lipidické peroxidace, nežli tomu bylo u kontrolní skupiny, a to průměrně 0,1 nmol·ml⁻¹. Avšak prokazatelně nejnižší koncentrace MDA byla stanovena u včel, které byly napadeny kleštíkem včelím. Koncentrace zde byla téměř nulová či hraničila s limitem kvantifikace. Statistická analýza ukázala, že skupiny kontrola *Varroa* a *Varroa* jsou vzhledem ke kontrole signifikantně odlišné. Avšak kontrola *Varroa* a *Varroa* vzájemně odlišné nejsou.



Obr. 16 Koncentrace MDA u včel napadených varoázou stanovená fluorescenční detekcí, kdy $n=10$ a koncentrace je uvedena v [nmol·ml⁻¹]. 1-way ANOVA $F(2, 24)= 8,200$; $p= 0,003$. Rozdílná písmena nad grafy ukazují, že jsou výsledky signifikantně odlišné, a to na základě Bonferroniho post-hoc testu. Stejná písmena znamenají, že skupiny nejsou signifikantně odlišné.

4.2.4.2 Měření vzorků včel ošetřených paraquatem

U včel ošetřených paraquatem není vidět žádný prokazatelný trend. U včelstva číslo 1 (Obr. 17 A) jsou koncentrace malondialdehydu velmi nízké, až neprokazatelné. Statistická analýza odhalila, že signifikantně odlišné jsou pouze kontrolní skupina s PBS po 3 hodinách. Zbylé skupiny odlišné nejsou. U včelstva číslo 24 (Obr. 17 B) byly koncentrace MDA vyšší. V první části grafu lze vidět opět klesající trend, kdy s mírou stresu se snižuje koncentrace malondialdehydu ve vzorku. U včel pocházejících z kontrolní skupiny byla stanovená koncentrace průměrně $0,06 \text{ nmol}\cdot\text{ml}^{-1}$. Po 3 hodinách od vpichu PBS roztoku (což byla kontrola pro stres způsobený mechanicky) se koncentrace MDA pohybovala okolo $0,05 \text{ nmol}\cdot\text{ml}^{-1}$. Nejnižší koncentrace byla stanovena u včel, které byly 3 hodiny od vpichu injekce s látkou paraquat. Po 6 hodinách od ošetření vidíme nárůst koncentrace, a to u obou skupin. Koncentrace MDA se v případě ošetření PBS roztokem vyšplhala průměrně na $0,11 \text{ nmol}\cdot\text{ml}^{-1}$, a u včel ošetřených paraquatem dokonce na $0,12 \text{ nmol}\cdot\text{ml}^{-1}$. Statistická analýza ukázala, že skupiny PBS a paraquat po 6 hodinách jsou signifikantně odlišné od zbylých skupin, avšak nejsou odlišné vzájemně.



Obr. 17 A) graf s hodnotami koncentrace MDA u včel ze včelstva číslo 1, kdy $n=10$, koncentrace je uvedena v $[\text{nmol}\cdot\text{ml}^{-1}]$. 1-way ANOVA $F(4, 45)= 2,503$; $p= 0,055$. B) graf s hodnotami koncentrace MDA u včel ze včelstva číslo 24, kdy $n=10$, koncentrace je uvedena v $[\text{nmol}\cdot\text{ml}^{-1}]$. 1-way ANOVA $F(4, 44)= 27,744$; $p= 0,000$. Rozdílná písmena nad grafy ukazují, že jsou výsledky signifikantně odlišné, a to na základě Bonferroniho post-hoc testu. Stejná písmena znamenají, že skupiny nejsou signifikantně odlišné.

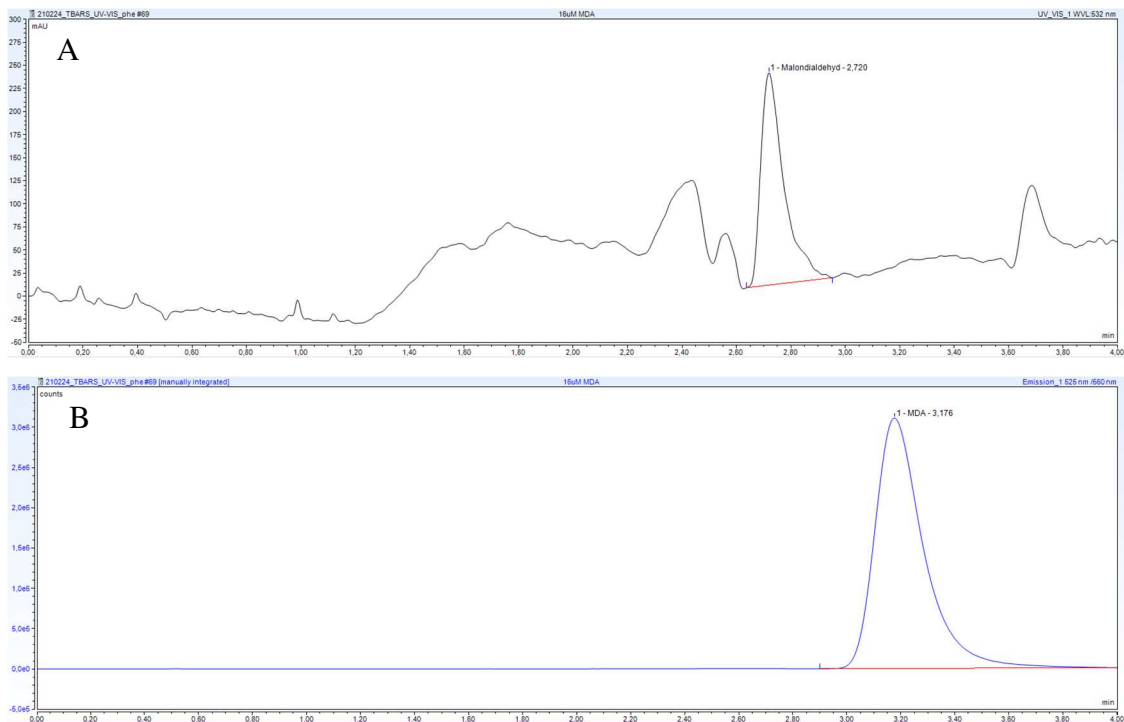
4.3 HPLC separace, detekce a kvantifikace produktu reakce TBARS

4.3.1 Optimalizace

Postup HPLC separace detekce a kvantifikace produktu reakce TBARS byl optimalizován, základní parametry pocházely ze článku (Mendes *et al.*, 2009), kde stanovovali MDA-TBA₂ produkt u ryb. Ve většině postupů se pracuje s fosfátovými pufrů, což může vést k ucpání HPLC systému, proto byla snaha nahradit fosfátový pufr jinou mobilní fází. Mobilních fází bylo vyzkoušeno několik, například voda, NH₄HCO₃ pufr, kyselina mravenčí ve vodě, nakonec i fosfátový pufr. Tato vodná mobilní fáze byla vždy kombinována s organickou fází – buď methanolem či acetonitrilem. Po sadě experimentů byla zvolena kombinace mobilní fáze A: 0,5% kyselina mravenčí a mobilní fáze B: acetonitril. Od začátku optimalizace separace probíhala na chromatografické koloně AERIS peptide 3,6 μm; XB-C18; avšak při eluci produktu TBARS reakce docházelo ke vzniku nesymetrických a chvostujících píků. Kolona byla nahrazena chromatografickou kolonou YMC-TRIART PHENYL, S-3 μm. Byly zkoušeny různé poměry mobilních fází a řada gradientů, dále byla vyzkoušena i isokratická varianta, ale výše uvedený gradient poskytoval nejvíce uspokojivé píky. Kvůli zkrácení doby separace byla zvýšena teplota separace na 35 °C. Jedním z problémů byly i samotné vzorky či standardy, kdy po jisté době docházelo vlivem krystalizace produktu k ucpání předkolony. Tento problém byl vyřešen použitím mikrocentrifugačních filtrů, pomocí nichž byly mikrokrystalky ze vzorku odstraněny, tudíž se nedostaly do systému a nehromadily se na předkoloně. Tyto mikrocentrifugační filtry byly vzhledem k jejich ceně a vysokému počtu vzorků používány opakovaně, kdy po použití byly ponechány na třepačce v 80% ethanolu k vyčištění.

Optimalizace byla primárně prováděna za pomoci UV-VIS detektoru, avšak kvůli vyšší specifitě a citlivosti byl zapojen i fluorescenční detektor. Detektory byly zapojeny sériově, proto je rozdíl v retenčním čase. Chromatogram A (Obr. 18 A) pochází z UV-VIS detekce, kdy byla stanovena absorbance při 532 nm. Pík malondialdehydu byl detekován v čase 2 minuty a 43 sekund. Chromatogram B (Obr. 18 B) je z fluorescenční detekce, kdy excitace probíhala při 525 nm a emise pak při 560 nm. Pík náležící produktu reakce byl detekován v čase 3 minuty a 11 sekund. V obou případech byl analyzován standard o koncentraci 16 nmol·ml⁻¹. Nerovnost baseline u UV-VIS stanovení byla přisuzována nižší kvalitě použitého acetonitrilu, proto byl vyzkoušen acetonitril o vyšší

kvalitě a čistotě. Následně došlo k poruše UV-VIS detektoru, proto bylo nadále pracováno pouze s FLD detektorem.

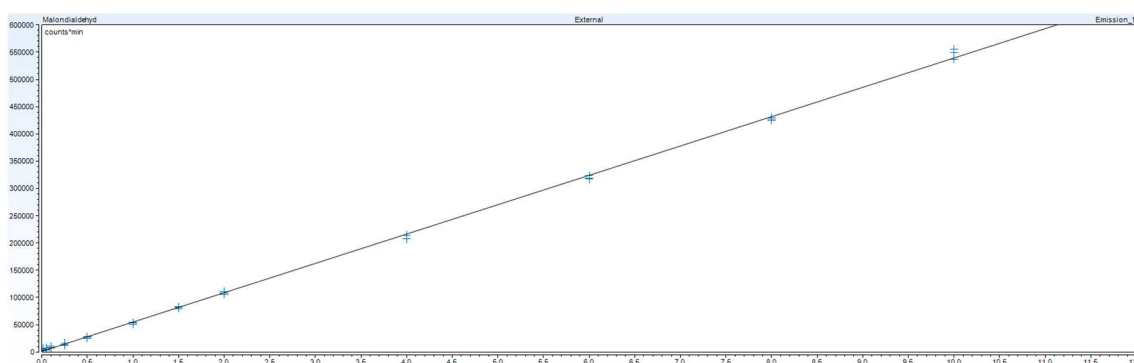


Obr. 18 Chromatogramy z analýzy standardu TEP o koncentraci $16\mu\text{M}$, kdy UV-VIS a FLD detektor byly zapojeny sériově za sebou. A) záznam z UV-VIS detektoru, pík pro malondialdehyd ve 2 minutě a 43 sekundě. B) záznam z FLD detektoru, pík pro malondialdehyd v čase 3 minuty a 11 sekund.

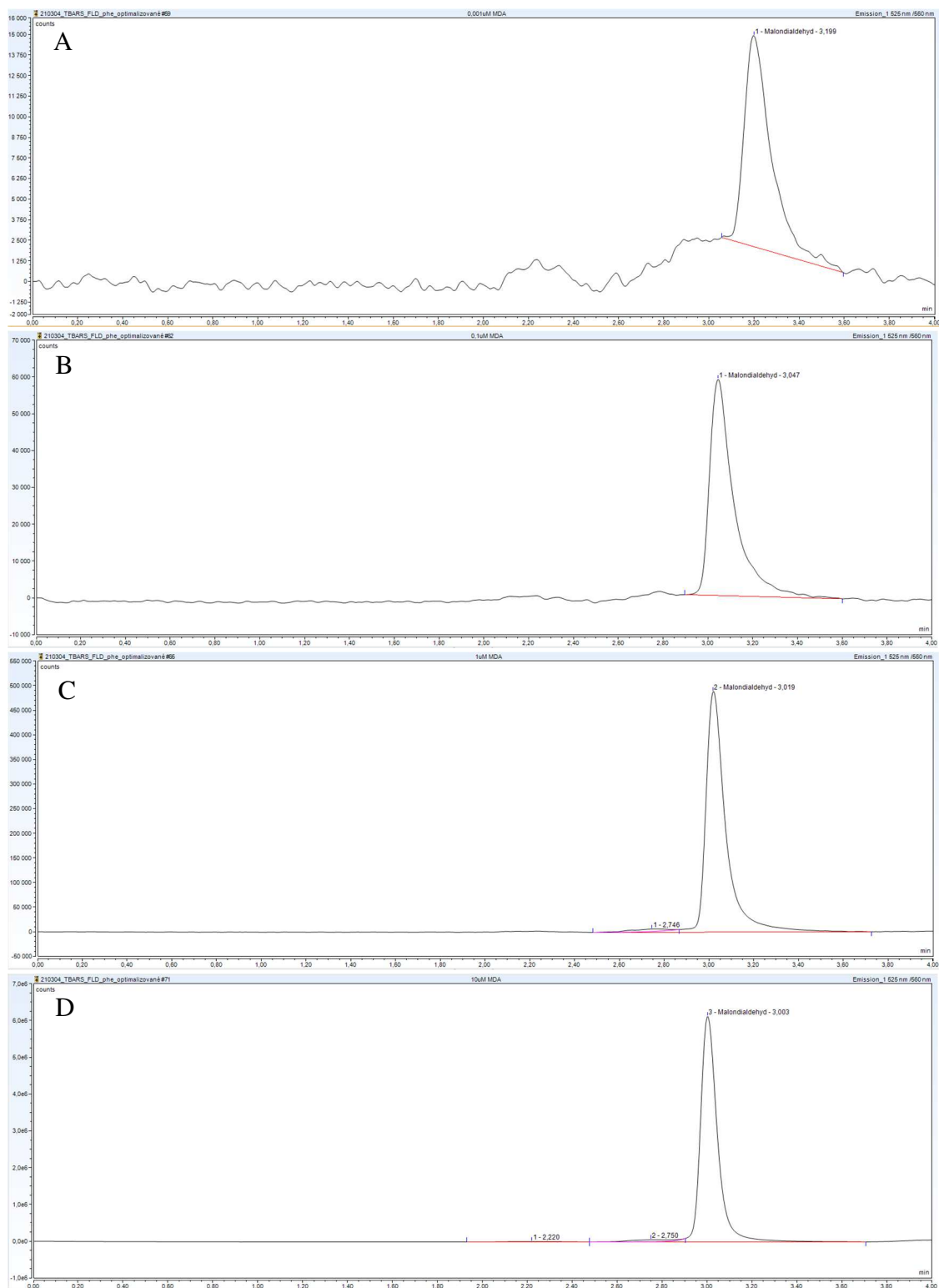
4.3.2 Kalibrační přímka

Následně byla proměřena kalibrační řada, jejíž příprava byla popsána v kapitole 3.3.2. Rozsah kalibrační řady byl od 0,001 do 10 nmol·ml⁻¹. Každý ze standardů byl proměřen třikrát. Po integraci ploch píků byla vytvořena kalibrační přímka (Obr. 19). Rovnice přímky je ve tvaru $y = 53777x + 364,62$. Hodnota spolehlivosti R^2 je zde 0,9993.

Chromatogramy níže (Obr. 20) jsou záznamy detekce fluorescence standardů o koncentracích ze začátku, středu a konce kalibrační řady (A= 0,001; B= 0,1; C= 1 a D= 10 nmol·ml⁻¹). Nejnižší koncentrace je lehce nad hranicí šumu. S narůstající koncentrací je vidět nárůst fluorescenčního signálu. Retenční čas píku je zde přibližně ve 3.minutě. Při koncentraci 0,001 nmol·ml⁻¹ je plocha píku 1810, při koncentraci 0,1 nmol·ml⁻¹ je plocha 7490. Při koncentraci 1 nmol·ml⁻¹ se plocha píku zvýšila na 51049 a při desetinásobné koncentraci je plocha píku 537263.



Obr. 19 Kalibrační přímka sestavená z hodnot z HPLC systému s FLD detektorem. Koncentrace standardů byly v jednotkách [nmol·ml⁻¹]. Kalibrační přímka je ve tvaru $y = 53777x + 364,62$. Hodnota spolehlivosti $R^2 = 0,9993$.



Obr. 20 Chromatogramy z analýzy standardů TEP pocházejících z kalibrační řady, a to z FLD detektoru. Chromatogram A je záznam detekce standardu TEP o koncentraci 0,001 nmol·ml⁻¹; na chromatogramu B je standard o koncentraci 0,1 nmol·ml⁻¹. Chromatogram C je z analýzy standardu o koncentraci 1 nmol·ml⁻¹ a poslední chromatogram D je standard o koncentraci 10 nmol·ml⁻¹.

4.3.3 Zpětné stanovení standardu TEP

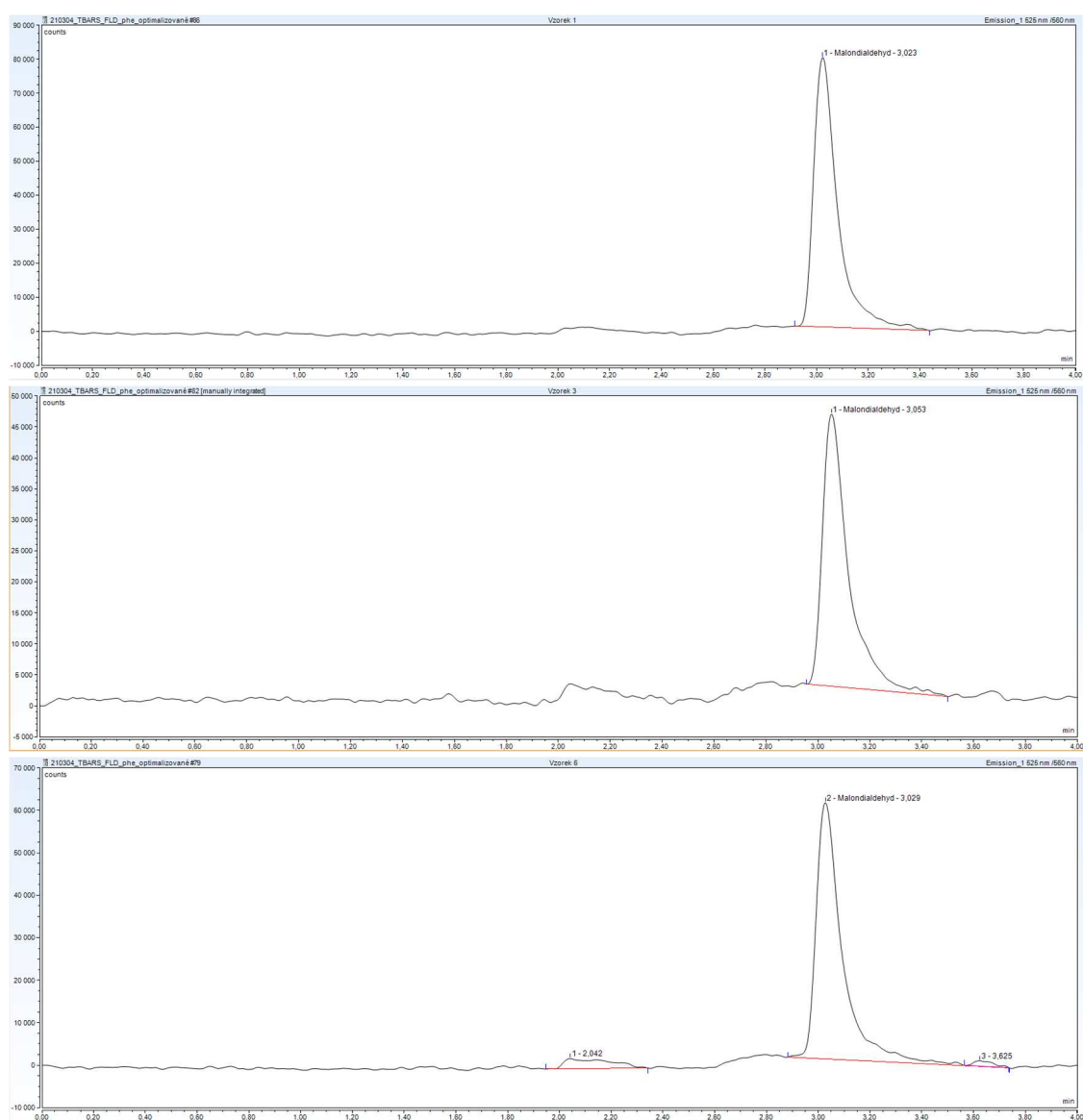
K ověření opakovatelnosti a správnosti stanovení byl zpětně stanovován standard, který byl přidán ke vzorkům včel. Koncentrace MDA před přidavkem standardu byla stanovena na průměrně $0,266 \text{ nmol}\cdot\text{ml}^{-1}$, a to integrací píku a dopočítáním pomocí kalibrační rovnice. Po přidavku $2\mu\text{M}$ standardu TEP byla naměřena koncentrace $3 \text{ nmol}\cdot\text{ml}^{-1}$, což je stanovení se systematickou odchylkou 43 %. Po přidavku $4\mu\text{M}$ standardu byla naměřena koncentrace průměrně $5,837 \text{ nmol}\cdot\text{ml}^{-1}$, BIAS zde byl 39 %. Po přidavku $6\mu\text{M}$ standardu byla chyba stanovení nejnižší (38,8 %), kdy se stanovená koncentrace rovnala $8,596 \text{ nmol}\cdot\text{ml}^{-1}$. Výsledky měření jsou uvedeny v tabulce níže (Tab. 5).

Tab. 5 Koncentrace malondialdehydu stanovená fluorescenční detekcí pomocí HPLC systému. V tabulce jsou koncentrace před a po přidavku standardu TEP o třech různých koncentracích. Rozdíl koncentrací po a před přidavkem standardu a BIAS, neboli systematická odchylka.

Vzorek	Koncentrace MDA před přidavkem TEP	Koncentrace MDA po přidavku $2\mu\text{M}$ TEP	Rozdíl	BIAS	Koncentrace MDA po přidavku $4\mu\text{M}$ TEP	Rozdíl	BIAS	Koncentrace MDA po přidavku $6\mu\text{M}$ TEP	Rozdíl	BIAS
	$[\text{nmol}\cdot\text{ml}^{-1}]$	$[\text{nmol}\cdot\text{ml}^{-1}]$			$[\text{nmol}\cdot\text{ml}^{-1}]$			$[\text{nmol}\cdot\text{ml}^{-1}]$		
1	0,282	3,002	2,720	0,720	5,759	5,477	1,477	8,393	8,111	2,111
2	0,255	3,148	2,893	0,893	5,885	5,630	1,630	8,622	8,367	2,367
3	0,261	3,248	2,987	0,987	5,867	5,606	1,606	8,774	8,513	2,513
průměr	0,266	3,133	2,867	0,867	5,837	5,571	1,571	8,596	8,330	2,330
%				43,333			39,275			38,839

4.3.4 Měření vzorků testovacích včel k ověření metody

Byly proměřeny pilotní vzorky včel bez indukce stresu pro ověření metodiky měření. Chromatogramy z těchto měření jsou uvedeny níže (Obr. 21). Pík pro malondialdehyd má i u reálných vzorků retenční čas ve 3. minutě a díky specifitě fluorescenčního stanovení je to jediný pík v chromatogramu. Plocha píku se u vzorků pohybuje mezi 6000-10000, což odpovídá koncentraci okolo $0,2 \text{ nmol}\cdot\text{ml}^{-1}$. Avšak vzorky byly při přípravě 2x zředěny, proto se konečné koncentrace MDA ve vzorcích pohybují okolo $0,4 \text{ nmol}\cdot\text{ml}^{-1}$. Vzorky byly měřeny v technických triplikátech. Zjištěné koncentrace ve vzorku jsou pak uvedeny v Tab. 6.



Obr. 21 Chromatogramy z analýzy vzorků včel. Záznamy pochází z fluorescenčního detektoru. Pík pro malondialdehyd je ve 3. minutě.

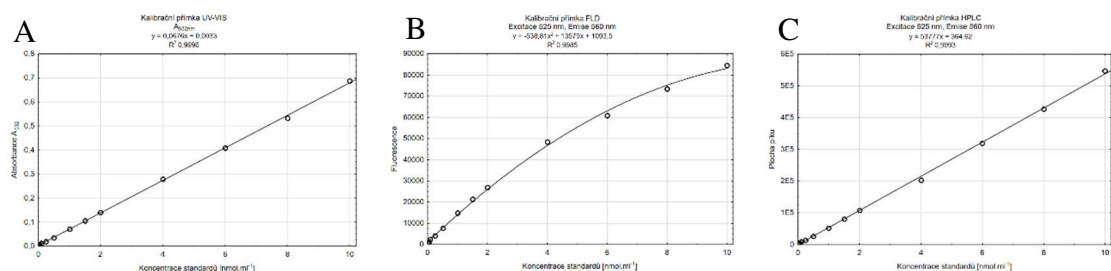
Tab. 6 Koncentrace MDA ve vzorcích včel a jejich průměr z technických triplikátů. Koncentrace je uvedena v jednotkách [nmol·ml⁻¹].

Vzorek	Koncentrace MDA-TBA ₂ produktu (HPLC-FLD) [nmol·ml ⁻¹]	Koncentrace MDA-TBA ₂ produktu (HPLC-FLD) [nmol·ml ⁻¹]	Koncentrace MDA-TBA ₂ produktu (HPLC-FLD) [nmol·ml ⁻¹]	Průměr koncentrace [nmol·ml ⁻¹]
1	0,452	0,402	0,472	0,442
2	0,312	0,216	0,178	0,235
3	0,154	0,168	0,144	0,155
4	0,344	0,342	0,334	0,340
5	0,268	0,230	0,220	0,239
6	0,192	0,216	0,204	0,204

4.4 Srovnání UV-VIS stanovení a fluorescenčního stanovení na mikrodestičkovém readru s fluorescenčním stanovení pomocí HPLC systému

4.4.1 Kalibrační přímky pro porovnání metod stanovení produktů TBARS na spektrofotometru a po HPLC separaci

Pro srovnání těchto tří způsobů stanovení produktu MDA-TBA₂ byla připravena kalibrační řada s rozsahem 0,001–10 nmol·ml⁻¹, která byla proměřena všemi třemi způsoby stanovení. Nejdříve byla proměřena absorbance při 532 nm na mikrodestičkovém readru. Následně byla proměřena také fluorescence těchto standardů při excitaci 525 nm a emisi 560 nm. Standardy z kalibrační řady byly následně separovány a byla stanovena jejich fluorescence. Z naměřených dat byly sestaveny kalibrační křivky (Obr. 22). Obr. 22 A je kalibrační přímka z UV-VIS detekce, s kalibrační rovnicí ve tvaru $y = 0,0676x + 0,0033$. Hodnota R^2 je 0,9996. Kalibrační křivka fluorescenčního stanovení (Obr. 22 B) není lineární, ale kvadratická, a rovnice je ve tvaru $y = -538,81x^2 + 13579x + 1093,5$. Hodnota spolehlivosti R^2 je 0,9985. Kalibrační rovnice pro kalibrační přímku (Obr. 22 C) z HPLC stanovení je ve tvaru $y = 53777x + 364,62$. Hodnota spolehlivosti je zde $R^2 = 0,9993$.



Obr. 22 A) Kalibrační přímka pro UV-VIS stanovení, s kalibrační rovnicí $y = 0,0676x + 0,0033$. Hodnota R^2 je 0,9996. B) Kalibrační křivka pro fluorescenční stanovení, s kalibrační rovnicí $y = -538,81x^2 + 13579x + 1093,5$. Hodnota spolehlivosti R^2 je 0,9985. C) Kalibrační přímka z HPLC stanovení. Kalibrační rovnice je ve tvaru $y = 53777x + 364,62$. Hodnota spolehlivosti je zde $R^2 = 0,9993$.

4.4.2 Měření vzorků cvičných včel

Následně byly připraveny vzorky včel, které byly opět proměřeny všemi třemi způsoby. Stanovené hodnoty byly následně převedeny na koncentrace MDA ve vzorku, a to přepočtem pomocí příslušné kalibrační rovnice. V tabulce níže (Tab. 7) jsou uvedeny stanovené koncentrace malondialdehydu. Koncentrace jsou podobné. Pro výsledky z fluorescenčního stanovení byl proveden párový t-test, kdy $df = 5$; $p = 0,671$. Výsledky byly opět testovány na hladině významnosti 0,05. Na základě tohoto párového t-testu může být řečeno, že obě metody poskytují stejné výsledky.

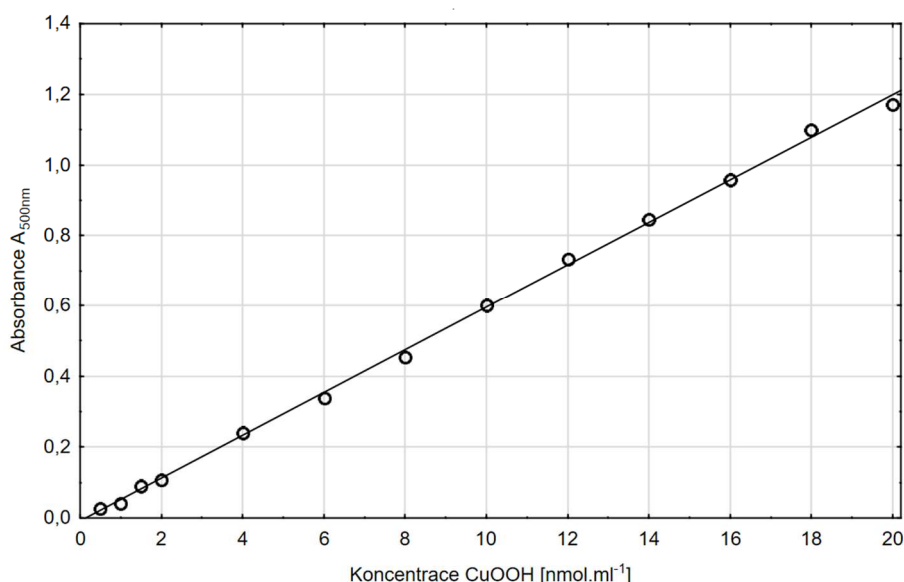
Tab. 7 Koncentrace MDA ve vzorcích včel stanovená jak na mikrodestičkovém readru (UV-VIS i FLD detekcí), tak pomocí HPLC systému s FLD detekcí. Koncentrace je uvedena v $[\text{nmol} \cdot \text{ml}^{-1}]$.

Vzorek	Spektrofotometrické stanovení		HPLC stanovení
	Koncentrace MDA-TBA ₂ produktu (UV-VIS) $[\text{nmol} \cdot \text{ml}^{-1}]$	Koncentrace MDA-TBA ₂ produktu (FLD) $[\text{nmol} \cdot \text{ml}^{-1}]$	Koncentrace MDA-TBA ₂ produktu (HPLC-FLD) $[\text{nmol} \cdot \text{ml}^{-1}]$
1	0,435	0,304	0,442
2	0,228	0,232	0,235
3	0,169	0,187	0,155
4	0,445	0,458	0,340
5	0,287	0,283	0,239

4.5 Stanovení hladiny lipidových hydroperoxidů pomocí thiokyanatanu železitého

Při tomto stanovení byl optimalizován již postup přípravy vzorku, kdy původní protokol (Galluzzi *et al.*, 2013) obsahoval homogenizaci a následnou extrakci HPLC vodou, následné vysrážení proteinů metafosforečnou kyselinou a poté přidavek chloroformu. Chloroformová vrstva byla poté používána jako vzorek. Vzhledem k tomu, že metodou FOX2 se také detekují lipidové hydroperoxydy, byl vyzkoušen stejný postup přípravy vzorku i pro tuto metodu. Tím pádem by pak opět mohl být použit stejný vzorek, jako u předchozích metod. Dle doporučení byly zpočátku používány skleněné zkumavky, jelikož chloroform jakožto rozpouštědlo by mohl uvolnit polymery z plastů mikrozkuvek a ty by mohly interferovat. Po několika zkouškách se standardem toto nebylo prokázáno, proto bylo následně pracováno s plastovými mikrozkuvkami (Eppendorf).

Na základě stanovení lipidových hydroperoxidů metodou FOX2 bylo nastaveno nové rozmezí kalibrační přímky. Byla proměřena kalibrační řada standardu kumenhydroperoxidu (CuOOH) o rozsahu 0,5–20 nmol·ml⁻¹. Z naměřených hodnot pak byla sestavena kalibrační přímka (Obr.23) a byla vygenerována kalibrační rovnice ve tvaru $y = 0,0605x - 0,0091$. Hodnota spolehlivosti R^2 byla 0,9988.



Obr. 23 Kalibrační přímka pro stanovení LOOH pomocí thiokyanatanu železitého, s použitím standardu CuOOH. Kalibrační rovnice je ve tvaru $y = 0,0605x - 0,0091$. Hodnota spolehlivosti $R^2 = 0,9988$.

U vzorků včel byly kromě různých způsobů přípravy vzorku vyzkoušeny také různé poměry reagensů, jako i různé doby inkubace, nebo použití triphenylphosphinu (TPP) jako redukčního činidla. Tím pádem by nemělo docházet k interferenci různých látek ve vzorku, protože vzorek s TPP je použit jako blank. Ovšem je nutná další optimalizace a správná kombinace výše uvedených parametrů.

5 DISKUZE

Oxidační degradace mastných kyselin vede k tvorbě lipidových hydroperoxidů (LOOH), které jsou jedním z markerů oxidačního poškození a slouží ke zkoumání oxidačního stresu. Pro stanovení jejich koncentrace existuje řada postupů, například HPLC separace spolu s elektroanalytickým stanovením, plynovou chromatografií, oxidací iodidů na triiodidový anion, měření tvorby konjugovaných dienů, nebo techniky založené na thiobarbiturové kyselině (TBA) atd. (DeLong *et al.*, 2002). Tyto metody jsou však většinou náročné na přístrojové vybavení, chemikálie, či vyžadují jisté kroky navíc, jako je extrakce lipidů či deproteinace vzorku. Nejvíce využívané jsou metody s použitím TBA, a to převážně protože jsou nenáročné a poměrně rychlé, avšak záleží na typu detekce. Dříve byla také používána jednoduchá a citlivá metoda pro měření lipidových hydroperoxidů s použitím thiokyanatanu jako indikátoru železitých iontů, které vznikly oxidací iontů železnatých (DeLong *et al.*, 2002). Nourooz-Zadeh (1994) poté tuto metodu upravili, a začali jako indikátor železitých iontů používat xylenolovou oranž. Je předpokládáno, že touto metodou lze měřit koncentrace nižší než 1 μM (Nouroozzadeh *et al.*, 1994).

V rámci metody FOX2 byla optimalizována doba inkubace, kdy první inkubace trvala 30 minut, což je dostatečná doba pro redukci LOOH pomocí TPP v MeOH. Druhá inkubace je 15minutová, což je čas, kdy dojde k vyvíjení zbarvení. Ve většině publikací jsou uváděny obě inkubace 30minutové (Griffiths *et al.*, 2000; Sodergren *et al.*, 1998). Avšak například (Jiang *et al.*, 1992) také zkrátily druhou inkubaci na 15 minut. V této práci zjištěné limity detekce a kvantifikace ukázaly, že citlivost metody je dostatečná pro stanovení lipidových hydroperoxidů u včel. Byla také ověřena stabilita lipidových hydroperoxidů v již připraveném extraktu, kdy byl vzorek připraven a proměřen jak bezprostředně po přípravě, tak i druhý den. V obou případech byla koncentrace LOOH shodná.

Byla ověřena opakovatelnost a správnost stanovení, a to přidavkem a zpětným stanovením standardu CuOOH. Tento experiment ukázal, že nejvyšší spolehlivost stanovení je ve střední části kalibrační řady, kde se pohybují také hodnoty v reálných vzorcích. Široké rozmezí kalibrační řady bylo zvoleno vzhledem k optimalizačním krokům a vzhledem k tomu, že se hladiny koncentrací různě mění v závislosti na použitém stresu.

Metoda TBARS stále zůstává jednou z nejvíce používaných metod pro měření oxidačního poškození, a to převážně díky své jednoduchosti. I když bylo v minulosti vytvořeno několik postupů stanovení založených na HPLC (a to převážně kvůli zvýšení specifity stanovení), tak je stále běžnější spektrofotometrické stanovení. Lykkesfeldt (2001) porovnávali fluorescenční stanovení pomocí HPLC s UV-VIS spektrofotometrií. Limit detekce pro UV-VIS stanovení byl příliš vysoký pro daný vzorek, proto raději používali spektrofluorimetrii, která má potřebnou citlivost (Lykkesfeldt, 2001). U UV-VIS detekce produktu TBARS reakce hrozí řada interferencí, například sacharidy a barviv. Hodges *et al.* (1999), kteří stanovovali lipidickou peroxidaci u rostlin, popsali způsob, jakým interferující látky eliminovat. A to měřením absorbance při dalších vlnových délkách a jejich následným přepočtem (Hodges *et al.*, 1999). V původních protokolech pro metodu TBARS se také uvádí inkubace vzorků při 90 °C, u (Hodges *et al.*, 1999) dokonce 95 °C. V rámci mé bakalářské práce (Pindřáková, 2019) byla tato teplota inkubace snížena na 60 °C, protože vysoká teplota ničila plast mikrodestiček, ve kterých inkubace probíhala. Nyní bylo zjištěno, že plast mikrodestiček neničí vysoká teplota, ale že při vysoké teplotě nejspíše vzniká produkt, který poškozuje povrchovou vrstvu jamek

V rámci této diplomové práce byly u metody TBARS vyzkoušeny tři typy stanovení. UV-VIS a fluorescenční detekce pomocí mikrodestičkového readru a fluorescenční detekce pomocí HPLC systému. Cílem bylo zjistit, které z těchto stanovení je optimální pro rutinní laboratorní analýzu. Byly sestaveny tři kalibrační přímky pro každý typ stanovení. Kalibrační křivka sestavená z měření fluorescence na mikrodestičkovém readru nebyla lineární, ale polynomická. Byla vytvořena rovnice v MS Excel pro výpočet koncentrace pomocí této kalibrační rovnice. Dále byla ověřena správnost všech tří typů stanovení. Nejlépe z tohoto testu vyšla fluorescenční detekce pomocí readru, kdy byla v tomto případě nejnižší systematická chyba stanovení. Nejvyšší chyba stanovení byla u FLD detekce pomocí HPLC systému. Je tudíž potřebná další optimalizace a následná validace této metody. U stanovení na mikrodestičkovém readru byly vypočítány limity detekce a kvantifikace, které jasně ukázaly, že fluorescenční stanovení je citlivější. HPLC stanovení zase ukázalo, že při fluorescenčním stanovení se specificky stanovuje požadovaný produkt, na rozdíl od UV-VIS stanovení, kde byly v chromatogramu viditelné i jiné látky – nejspíše vedlejší produkty reakce, a to i v případě standardu. U vzorků včel nebylo UV-VIS stanovení po separaci na koloně provedeno, a to z důvodu

poruchy tohoto detektoru. Pro spolehlivé ověření, že se v daném píku vyskytuje pouze námi požadovaný produkt by byla potřeba MS/MS analýza, která může být předmětem další optimalizace tohoto stanovení.

Z výsledků zpětného stanovení přidaného standardu TEP ze vzorku a dalších měření se optimálním stanovením zdá být fluorescenční stanovení na mikrodestičkovém readru, protože fluorescenční stanovení je citlivější a specifitější než UV-VIS stanovení. U UV-VIS stanovení mohou různé látky interferovat a tím nadsadnocovat výsledky. V případě včel, u kterých byl vyvolán oxidační stres, koncentrace malondialdehydu ve vzorcích včel klesla až k hodnotám okolo $0,1 \text{ nmol}\cdot\text{ml}^{-1}$, což pro UV-VIS detektor bylo pod LOQ. Mezi stanovením pomocí mikrodestičkového readru a pomocí HPLC je výhodnější použití mikrodestičkového readru, jelikož je toto stanovení rychlejší a levnější. U HPLC stanovení je navíc nutný mezikrok s filtrací vzorku, kde může docházet ke ztrátám produktu a také příprava vzorků se tak protáhne.

Po optimalizaci byla stanovena koncentrace lipidových hydroperoxidů u včel, u kterých byl vyvolán oxidační stres. V tomto případě byla provedena infestace včel varroázou. Byly to již popsané tři skupiny včel, kdy kontrolní pocházely ze zdravého včelstva, kontrola *Varroa* včely pocházely ze včelstva nakaženého varoázou, avšak samy napadeny nebyly. A *Varroa* včely na sobě přímo nesly roztoče *Varroa*. Varroáza je jednou z nemocí včel, která trápí včelaře po celém světě. Byly použity zadečky včel, ve kterých se nachází tukové těleso, což zaručuje přítomnost lipidů. Měřením bylo prokázáno, že se zvyšující se mírou stresu klesá koncentrace studovaných látek. Tento fakt neodpovídá předpokladu, který říká, že se zvyšující se mírou oxidačního stresu se zvyšuje koncentrace ROS ve vzorku. Tím se zvyšuje míra lipidické peroxidace a tím vyšší by měla být koncentrace lipidových hydroperoxidů, což je primární produkt LPX. Stanovený trend byl však následně potvrzen i metodou TBARS, kde koncentrace malondialdehydu jako jednoho z koncových produktů lipidické peroxidace také klesala s rostoucí mírou stresu. Tato skutečnost může být způsobena tím, že roztoč *Varroa destructor* parazituje na tukovém tělese včel (Ramsey *et al.*, 2019), čímž dochází k úbytku celkového množství lipidů v těle včely. To však nevysvětluje úbytek koncentrace jak lipidových hydroperoxidů, tak i malondialdehydu u včel z nakaženého včelstva, na kterých však roztoč přímo neparazitoval. K objasnění by mohlo napomoci stanovení celkového množství lipidů v daných vzorcích včel, avšak toto stanovení není pro

stanovení u včel optimalizováno. To bude předmětem dalšího zkoumání. Jelikož takovýto typ experimentu nebyl dříve prováděn ani u včel ani u jiných organismů, mohu porovnávat pouze s výsledky mé bakalářské práce (Pind'áková, 2019). V rámci té jsem stanovovala míru lipidické peroxidace metodou TBARS u včel z imunizačního experimentu, kdy byly opět tři skupiny – kontrolní včely; včely jimž byl injekcí podán roztok PBS a včely, kterým byla aplikována suspenze s bakteriemi *Paenibacillus larvae*. V tomto případě byla také koncentrace malondialdehydu u kontrolních včel vyšší, než-li byla koncentrace u včel laboratorně imunizovaných. V tomto případě však neexistuje možnost úbytku lipidů způsobeného roztočem.

Dále bylo pracováno se vzorky včel, u kterých byl uměle vyvolán oxidační stres. K tomu byla využita látka paraquat, což je herbicid, jenž je pro včely škodlivý a způsobuje oxidační stres. Paraquat; neboli 1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridilium dichlorid; produkuje superoxidový radikál, a to přímo skrze cyklickou redoxní reakci s kyslíkem a způsobuje řadu buněčných poškození. To bylo popsáno v (Seehuus *et al.*, 2006) a (Bus a Gibson, 1984). Tato látka bývá široce využívána pro studium oxidačního stresu, například byla využita v experimentu od Li-Byarlay *et al.* (2016), kde zkoumali oxidační stres u trubců a jejich rozdílnou toleranci. Mimo jiné zde stanovovali koncentraci malondialdehydu, avšak pomocí TBARS kitu (Li-Byarlay *et al.*, 2016). V rámci mého experimentu se po aplikaci paraquatu koncentrace lipidových hydroperoxidů zvýšila. Což koreluje s předpokladem, že se zvyšující se mírou oxidačního stresu se zvyšuje koncentrace lipidových hydroperoxidů. Tyto ošetřené vzorky byly odebrány po 3 a 6 hodinách, kdy je vidět rozdíl v koncentracích, avšak pro stanovení trendu či křivky by bylo potřeba více časových odběrů a také příslušnou kontrolu. Tyto kontrolní včely byly odebrány po 24 hodinách. U těchto včel byla také stanovována koncentrace malondialdehydu metodou TBARS. Koncentrace malondialdehydu v těchto vzorcích byly velmi nízké, takřka nulové, proto z výsledků nevyvozuji žádný závěr. Nízká koncentrace malondialdehydu může být dána mladším věkem včel, které byly v době ošetření pouze 3 dny staré a nemusela zde být taková koncentrace lipidů. Další možností, proč je koncentrace malondialdehydu tak nízká, je brzký odběr vzorků. Kdy tří a šesti hodinový interval od ošetření nemusel být dostatečně dlouhý k vytvoření sekundárního koncového produktu lipidické peroxidace.

Dalším předmětem zkoumání by mohla být již zmíněná MS/MS analýza produktu reakce TBARS, aby se potvrdilo tvrzení, že se fluorescenčně stanovuje pouze tento produkt. Dále je potřeba dotáhnout optimalizaci HPLC separace, detekce a kvantifikace produktu metody TBARS a také dokončení optimalizace metody s použitím thiokyanatanu železitého pro stanovení LOOH. Tyto optimalizované metody budou nadále využity ke stanovení míry oxidačního stresu u včel.

6 ZÁVĚR

V rámci teoretické části diplomové práce bylo cílem vypracovat literární rešerši se zaměřením na reaktivní formy kyslíku u hmyzu. V práci byl charakterizován vznik ROS, jakožto i antioxidační systém, který tyto kyslíkové radikály zháší.

Dále byly popsány jak fyziologické, tak škodlivé vlivy ROS, mezi které patří i lipidická peroxidace, která byla stanovena v rámci praktické části. V další části byly shrnuty poznatky o imunitě včel a jejím propojení s dráhami oxidačního stresu.

Následně byly popsány metody stanovení parametrů oxidačního stresu a teoretické popsání HPLC systému a vysokotlaké účinné chromatografie jako takové.

Praktická část byla zaměřena na optimalizaci metod pro stanovení lipidické peroxidace. První metodou byla metoda FOX2, pomocí níž se stanovují lipidové hydroperoxydy, které vznikají během lipidické peroxidace. Toto stanovení, jako i příprava vzorků byly optimalizovány, byla potvrzena správnost stanovení. Tato optimalizovaná metoda byla následně použita pro zjištění koncentrace lipidových hydroperoxidů ve vzorcích *Varroa* včel a byl vytvořen profil koncentrace LOOH v rámci skupin včel, u kterých byl uměle vyvolán oxidační stres. V případě *Varroa* včel se koncentrace lipidových hydroperoxidů se zvyšující se mírou stresu snižovala. U skupiny vzorků, kde byl oxidační stres indukován chemicky, se naopak množství LOOH se zvyšující se mírou stresu zvyšovala. Další optimalizovanou metodou byla metoda TBARS, pomocí níž se stanovuje malondialdehyd, což je koncový produkt lipidické peroxidace. Bylo optimalizováno fluorescenční stanovení tohoto produktu, u něž byla předpokládána vyšší citlivost a specifita. Tento předpoklad byl potvrzen sérií experimentů. Fluorescenčním stanovením metody TBARS byly zjištěny koncentrace malondialdehydu u *Varroa* včel, kdy opět se zvyšující se mírou stresu klesala koncentrace MDA ve vzorku. Včely, u kterých byl oxidační stres vyvolán látkou paraquat byla koncentrace MDA velmi nízká, i tak byl pozorován nárůst koncentrace MDA v čase.

Dále byla optimalizována HPLC separace, detekce a kvantifikace produktu reakce TBARS. Bylo optimalizováno hned několik parametrů, jako mobilní fáze, kolona, teplota separace, gradient a tak dále. Bylo pracováno jak s DAD, tak i FLD detektorem. Byla ověřena správnost stanovení a byly proměřeny vzorky cvičných včel. Byly srovnány výsledky z UV-VIS stanovení a fluorescenčního stanovení pomocí mikrodestičkového readru a fluorescenčního stanovení pomocí HPLC systému. Z celkových výsledků se

ukázalo nejvhodnější fluorescenční stanovení na mikrodestičkovém readru, protože je citlivější a specifitější nežli UV-VIS stanovení, kde hrozí jisté interference. A zároveň je toto stanovení pomocí readru rychlejší a levnější nežli fluorescenční detekce na HPLC.

U stanovení lipidových hydroperoxidů pomocí thiokyanatanu železitého byla zahájena optimalizace přípravy vzorků a postupu měření standardů.

7 LITERATURA

- Abuja, P.M., Albertini, R. (2001): Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clinica Chimica Acta* **1-2**, 1-17.
- Antunez, K., Martin-Hernandez, R., Prieto, L., Meana, A., Zunino, P., Higes, M. (2009): Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Environmental microbiology* **9**, 2284-2290.
- Baltacioglu, E., Akalin, F.A., Alver, A., Deger, O., Karabulut, E. (2008): Protein carbonyl levels in serum and gingival crevicular fluid in patients with chronic periodontitis. *Archives of Oral Biology* **8**, 716-722.
- Barzilai, A., Yamamoto, K.I. (2004): DNA damage responses to oxidative stress. *Dna Repair* **8-9**, 1109-1115.
- Beneš, L. (2008): Antioxidancia. *Praktické lékařství* **4**, 183-185.
- Borba, R.S., Klyczek, K.K., Mogen, K.L., Spivak, M. (2015): Seasonal benefits of a natural propolis envelope to honey bee immunity and colony health. *Journal of Experimental Biology* **22**, 3689-3699.
- Brutscher, L.M., Daughenbaugh, K.F., Flenniken, M.L. (2015): Antiviral defense mechanisms in honey bees. *Current Opinion in Insect Science* 71-82.
- Bus, J.S., Gibson, J.E. (1984): Paraquat - Model for Oxidant-Initiated Toxicity. *Environmental health perspectives* **APR**, 37-46.
- Carocho, M., Ferreira, I. (2013): A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology* 15-25.
- Chelikani, P., Fita, I., Loewen, P.C. (2004): Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences* **2**, 192-208.
- Cooper, N., Khosravan, R., Erdmann, C., Fiene, J., Lee, J.W. (2006): Quantification of uric acid, xanthine and hypoxanthine in human serum by HPLC for pharmacodynamic studies. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **1-2**, 1-10.
- Covarrubias, L., Hernandez-Garcia, D., Schnabel, D., Salas-Vidal, E., Castro-Obregon, S. (2008): Function of reactive oxygen species during animal development: Passive or active? *Developmental biology* **1**, 1-11.
- Cremer, S., Armitage, S.A.O., Schmid-Hempel, P. (2007): Social immunity. *Current Biology* **16**, R693-R702.
- Dalle-Donne, I. (2006): Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **2**, 389-406.
- Dalle-Donne, I., Giustarini, D., Colombo, R., Rossi, R., Milzani, A. (2003): Protein carbonylation in human diseases. *Trends in molecular medicine* **4**, 169-176.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D., Milzani, A. (2006): Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clinical chemistry* **4**, 601-623.
- Danihlik, J., Aronstein, K., Petrivalsky, M. (2015): Antimicrobial peptides: a key component of honey bee innate immunity Physiology, biochemistry, and chemical ecology. *Journal of Apicultural Research* **2**, 123-136.
- DeLong, J.M., Prange, R.K., Hodges, D.M., Forney, C.F., Bishop, M.C., Quilliam, M. (2002): Using a modified ferrous oxidation-xylenol orange (FOX) assay for detection of lipid hydroperoxides in plant tissue. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2**, 248-254.
- Denisov, Afanas'ev (2005): *Oxidation and antioxidants in organic chemistry and biology*. 1st ed., CRC Press, Boca Raton, 1024.
- Evans, J.D., Aronstein, K., Chen, Y.P., Hetru, C., Imler, J.-., Jiang, H., Kanost, M., Thompson, G.J., Zou, Z., Hultmark, D. (2006): Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect molecular biology* **5**, 645-656.
- Fujii, J., Iuchi, Y., Okada, F. (2005): Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system. *Reproductive Biology and Endocrinology* **43**.

- Galluzzi, L., Vitale, I., Kepp, O., Kroemer, G. (2013): *Cell Senescence*. 1st ed., Humana Press, 538.
- Ganz, T. (2003): Defensins: Antimicrobial peptides of innate immunity. *Nature Reviews Immunology* **9**, 710-720.
- Garratt, L.W., Mistry, V., Singh, R., Sandhu, J.K., Sheil, B., Cooke, M.S., Sly, P.D., ARESTCF (2010): Interpretation of urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine is adversely affected by methodological inaccuracies when using a commercial ELISA. *Free Radical Biology and Medicine* **11**, 1460-1464.
- Gonzalez-Santoyo, I., Cordoba-Aguilar, A. (2012): Phenoloxidase: a key component of the insect immune system. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **1**, 1-16.
- Griffiths, G., Leverenz, M., Silkowski, H., Gill, N., Sanchez-Serrano, J.J. (2000): Lipid hydroperoxide levels in plant tissues. *Journal of experimental botany* **349**, 1363-1370.
- Halliwell, B. (2007): Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society transactions* 1147-1150.
- Hodges, D.M., DeLong, J.M., Forney, C.F., Prange, R.K. (1999): Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* **4**, 604-611.
- Jamel, M.J., Miranda Pereira, Lara de Paula, Mello, N.B., Araujo Eleutherio, E.C., Schanaider, A. (2010): Blood carbonyl protein measurement as a specific oxidative stress biomarker after intestinal reperfusion in rats. *Acta Cirurgica Brasileira* **1**, 59-62.
- James, R.R., Xu, J. (2012): Mechanisms by which pesticides affect insect immunity. *Journal of invertebrate pathology* **2**, 175-182.
- Jiang, Z.Y., Hunt, J.V., Wolff, S.P. (1992): Ferrous Ion Oxidation in the Presence of Xylenol Orange for Detection of Lipid Hydroperoxide in Low-Density-Lipoprotein. *Analytical Biochemistry* **2**, 384-389.
- Kasai (1986): Hydroxylation of Guanine in Nucleosides and DNA at the C-8 Position by Heated Glucose and Oxygen Radical-Forming Agents.
- Kinter, M. (1995): Analytical Technologies for Lipid Oxidation-Products Analysis. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **1-2**, 223-236.
- Kodrik, D., Bednarova, A., Zemanova, M., Krishnan, N. (2015): Hormonal Regulation of Response to Oxidative Stress in Insects-An Update. *International Journal of Molecular Sciences* **10**, 25788-25816.
- Lamb, D.C., Waterman, M.R. (2013): Unusual properties of the cytochrome P450 superfamily. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* **1612**, 20120434.
- Lengger, C., Schoch, G., Topp, H. (2000): A high-performance liquid chromatographic method for the determination of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in urine from man and rat. *Analytical Biochemistry* **1**, 65-72.
- Li-Byarlay, H., Huang, M.H., Simone-Finstrom, M., Strand, M.K., Tarcy, D.R., Rueppell, O. (2016): Honey bee (*Apis mellifera*) drones survive oxidative stress due to increased tolerance instead of avoidance or repair of oxidative damage. *Experimental gerontology* 15-21.
- Lykkesfeldt, J. (2001): Determination of malondialdehyde as dithiobarbituric acid adduct in biological samples by HPLC with fluorescence detection: Comparison with ultraviolet-visible spectrophotometry. *Clinical chemistry* **9**, 1725-1727.
- Mendes, R., Cardoso, C., Pestana, C. (2009): Measurement of malondialdehyde in fish: A comparison study between HPLC methods and the traditional spectrophotometric test. *Food Chemistry* **4**, 1038-1045.
- Miwa, S., Beckman, K.B. (2008): *Oxidative Stress in Aging*.
- Morgan, M.J., Liu, Z. (2011): Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kappa B signaling. *Cell research* **1**, 103-115.
- Nouroozzadeh, J., Tajaddinisarmadi, J., Wolff, S.P. (1994): Measurement of Plasma Hydroperoxide Concentrations by the Ferrous Oxidation Xylenol Orange Assay in Conjunction with Triphenylphosphine. *Analytical Biochemistry* **2**, 403-409.

- Nováková, L., Douša, M. (2013): *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. 1.th ed., Lucie Nováková, Michal Douša, Hradec Králové, 235.
- Ownby, C.L., Powell, J.R., Jiang, M.S., Fletcher, J.E. (1997): Melittin and phospholipase A(2) from bee (*Apis mellifera*) venom cause necrosis of murine skeletal muscle in vivo. *Toxicon* **1**, 67-80.
- Perkins, N.D., Gilmore, T.D. (2006): Good cop, bad cop: the different faces of NF-kappa B. *Cell death and differentiation* **5**, 759-772.
- Pindřáková, E. (2019): *Vliv patogenů a parazitů na antioxidační systém včely medonosné (Apis mellifera)*. Bakalářská práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Česká Republika.
- Pirinccioglu, A.G., Gokalp, D., Pirinccioglu, M., Kizil, G., Kizil, M. (2010): Malondialdehyde (MDA) and protein carbonyl (PCO) levels as biomarkers of oxidative stress in subjects with familial hypercholesterolemia. *Clinical biochemistry* **15**, 1220-1224.
- Ramsey, S.D., Ochoa, R., Bauchan, G., Gulbranson, C., Mowery, J.D., Cohen, A., Lim, D., Joklik, J., Cicero, J.M., Ellis, J.D., Hawthorne, D., vanEngelsdorp, D. (2019): *Varroa destructor* feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **5**, 1792-1801.
- Randolt, K., Gimple, O., Geissendoerfer, J., Reinders, J., Prusko, C., Mueller, M.J., Albert, S., Tautz, J., Beier, H. (2008): Immune-Related Proteins Induced in the Hemolymph After Aseptic and Septic Injury Differ in Honey Bee Worker Larvae and Adults. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **4**, 155-167.
- Salminen, T.S., Vale, P.F. (2020): *Drosophila* as a Model System to Investigate the Effects of Mitochondrial Variation on Innate Immunity. *Frontiers in Immunology* 521.
- Santos, A.L., Sinha, S., Lindner, A.B. (2018): The Good, the Bad, and the Ugly of ROS: New Insights on Aging and Aging-Related Diseases from Eukaryotic and Prokaryotic Model Organisms. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 1941285.
- Seehuus, S.C., Norberg, K., Gimsa, U., Krekling, T., Amdam, G.V. (2006): Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **4**, 962-967.
- Shacter, E. (2000): Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug metabolism reviews* **3-4**, 307-326.
- Shigenaga, M.K., Ames, B.N. (1991): Assays for 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine - a Biomarker of In vivo Oxidative Dna Damage. *Free Radical Biology and Medicine* **3-4**, 211-216.
- Sodergren, E., Nourooz-Zadeh, J., Berglund, L., Vessby, B. (1998): Re-evaluation of the ferrous oxidation in xylenol orange assay for the measurement of plasma lipid hydroperoxides. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **3**, 137-146.
- StAngelo, A.J. (1996): Lipid oxidation in foods. *Critical reviews in food science and nutrition* **3**, 175-224.
- Štípek, S. (2000): *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci*. 1.th ed., Grada Publishing, Praha, 320.
- Tang, Y., Long, J., Liu, J. (2014): Hyperglycemia-Associated Oxidative Stress Induces Autophagy: Involvement of the ROS-ERK/JNK-p53 Pathway. 115.
- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C.J., Telser, J. (2004): Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and cellular biochemistry* **1-2**, 37-56.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J. (2007): Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **1**, 44-84.
- Weidinger, A., Kozlov, A.V. (2015): Biological Activities of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Oxidative Stress versus Signal Transduction. *Biomolecules* **2**, 472-484.
- Williams, G.R., Alaux, C., Costa, C., Csaki, T., Doublet, V., Eisenhardt, D., Fries, I., Kuhn, R., McMahon, D.P., Medrzycki, P., Murray, T.E., Natsopoulou, M.E., Neumann, P., Oliver, R., Paxton, R.J., Pernal, S.F., Shutler, D., Tanner, G., van der Steen, Jozef J. M., Brodschneider, R. (2013): Standard methods for maintaining adult *Apis mellifera* in cages under in vitro laboratory conditions. *Journal of Apicultural Research* **1**, 52.1.04.

- Wu, L.L., Chiou, C.C., Chang, P.Y., Wu, J.T. (2004): Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clinica Chimica Acta* **1-2**, 1-9.
- Young, A.J., Lowe, G.M. (2001): Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1**, 20-27.

8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

4-HNE	4-hydroxy-2-nonenal
8-OHdG	8-hydroxy-2'-deoxyguanosin
AMK	aminokyselina
AmP	antimikrobiální peptid
ANOVA	analýza rozptylu
ATP	adenosintrifosfát
BHT	butylhydroxytoluene
BIAS	systematická odchylka
COX	cyklooxygenasa
CuOOH	kumenhydroperoxidu
DNA	kyselina deoxyribonukleová
DNPH	2,4-dinitrophenylhydrazin
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
FLD	fluorescenční detektor
FOX2	ferrous oxidation in xylenol orange version 2
GSH	glutathion
HIF	hypoxií indukovaný faktor
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
LOD	limit detekce
LOOH	lipidové hydroperoxydy
LOQ	limit kvantifikace
LPX	lipidová peroxidace
MDA	malondialdehyd
MeOH	methanol
NF-κB	nuclear factor κB

NOX	NADPH-oxidasa
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns
PBS	fosfátový pufr
PCO	karbonylace proteinů
PO	fenoloxidasa
proPO	profenoloxidasa
proPO-AS	profenoloxidasu aktivující systém
PRR	receptory pro rozpoznání patogenů
PUFA	polynenasycené mastné kyseliny
RNA	ribonukleová kyselina
RNS	reaktivní formy dusíku
ROS	reaktivní formy kyslíku
TBA	kyselina thiobarbiturová
TBARS	thiobarbituric acid reactive substances
TEP	tetraethoxypropan
TPP	triphenylphosphine
UV-VIS	ultrafialovo-viditelná spektroskopie