

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Vliv patogenů a parazitů na antioxidační systém včely
medonosné (*Apis mellifera*)**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Eliška Pind'áková
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Jiří Danihlák, Ph.D.
Rok:	2019

Prohlašuji, že jsem bakalářskou 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 5. 5. 2019

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat panu Mgr. Jiřímu Danihlíkovi, Ph.D., za odborné vedení, cenné rady a poskytnuté konzultace při vypracování jak teoretické, tak i experimentální části mé bakalářské práce. Děkuji také všem členům Katedry biochemie za přátelský přístup a všestrannou pomoc při práci v laboratoři.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Eliška Pindřáková
Název práce	Vliv patogenů a parazitů na antioxidační systém včely medonosné (<i>Apis mellifera</i>)
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Jiří Danihlík, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2019

Abstrakt

Včela medonosná (*Apis mellifera*) je jedním z nejvýznamnějších zástupců společenského hmyzu se sociální imunitou. Včely jsou důležitými opylovateli rostlin a také producenty včelích produktů, jako je med, propolis a vosk. Zdraví včel je jedním z velmi diskutovaných témat poslední doby. Studium imunitního systému včel by mohlo vést k aplikaci poznatků do praxe. Řada faktorů způsobuje u včel oxidační stres, který může být zapříčiněn nahromaděním reaktivních kyslíkatých radikálů (ROS).

V teoretické části této bakalářské práce jsou shrnuty poznatky o enzymatickém i neenzymatickém vzniku ROS a zároveň je zde popsán antioxidační systém včel. Popsány zde byly obranné mechanismy, mezi které patří antioxidační enzymy jako je katalasa, superoxiddismutasa či peroxidasa, ale také přírodní látky s antioxidačními účinky. Následuje kapitola o včelích patogenech a parazitech a jejich vliv na zdraví včelstev.

V rámci experimentální části byly optimalizovány a popsány metody pro spektrofotometrické stanovení specifické aktivity katalasy a superoxiddismutasy. Byl změřen profil specifické aktivity katalasy v průběhu sezóny u včel odebraných z experimentálních včelstev. Specifická aktivita katalasy byla měřena pro každou tělní část zvlášť. Nejvyšší specifická aktivita katalasy byla v zadečcích včel, zatímco v hrudnících včel je specifická aktivita nižší. V *in vitro* pokusu byly 10denní včely uspány pomocí CO₂, imunizovány roztokem PBS nebo imunizovány roztokem PBS s bakteriální suspenzí. Specifická aktivita katalasy a superoxiddismutasy byla měřena v zadečcích imunizovaných včel. Nejvyšší specifická aktivita katalasy a superoxiddismutasy byla zjištěna u včel stimulovaných vpichem PBS s bakteriální suspenzí. Opačný trend však byl zjištěn u lipidické peroxidace, pro kterou byla optimalizována metodika spektrofotometrického měření koncentrace malondialdehydu metodou TBARS.

Klíčová slova	Včela medonosná, antioxidační systém, reaktivní formy kyslíku, katalasa, superoxiddismutasa, lipidická peroxidace
Počet stran	67
Počet příloh	2
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Eliška Pindřáková
Title	Impacts of pathogens and parasites on antioxidave system of honey bees (<i>Apis mellifera</i>)
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Jiří Danihlík, Ph.D.
The year of presentation	2019

Abstract

Honey bees (*Apis mellifera*) are one of the most important representative of insects with social immunity. Bees are important pollinators for plants, additionally they produce honey, propolis and wax. Nowadays, health of honey bees is one of the most discussed topics. Research of honey bee immune system could have outcomes for practical beekeeping. Accumulation of reactive oxygen species (ROS) cause oxidative stress, which is induced by many factors – such as nutrition, xenobiotics, flight activity etc.

The theoretical part of the bachelor thesis summarises knowledge about enzymatic and non-enzymatic formation of ROS and antioxidant system. Protective mechanisms based on antioxidative enzymes such as catalase, superoxid dismutase, peroxidase, and natural substances with antioxidative effect are described. Honey bee pathogens and parasites and their impact on oxidative stress are also reviewed.

Methods of spectrophotometric determination of specific activity of catalase and superoxid dismutase were optimized. The profile of specific activity of catalase for each part of experimental bees within months was determined. The specific activity of catalase was measured for each body part separately. The highest specific activity of catalase was in abdomens, while in thoraces was the specific activity lower. In an *in vitro* experiment, 10-days old bees were anesthetized by CO₂, immunized by PBS solution or immunized by PBS solution with bacterial suspension. The specific activity of catalase and superoxide dismutase was measured in abdomens of experimental bees. The highest specific activity of catalase and superoxide dismutase was found in bees stimulated by PBS with bacterial suspension. However, the opposite trend displayed lipid peroxidation. Fast spectrophotometric method for measuring the malondialdehyde concentration by the TBARS method was optimized.

Keywords	Honey bee, antioxidant system, reactive oxygen species, catalase, superoxid dismutase, lipid oxidation
Number of pages	67
Number of appendices	2
Language	Czech

OBSAH

1	ÚVOD	11
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	12
2.1	VZNIK REAKTIVNÍCH FOREM KYSLÍKU	12
2.1.1	Zdroje ROS.....	13
2.1.1.1	Mitochondrie	13
2.1.2	Enzymy jako zdroje ROS	15
2.1.2.1	NADPH-oxidasa (Nox, EC: 1.6.3.1).....	15
2.1.2.2	Cytochrom P450 (P450 nebo CYP).....	15
2.1.2.3	Xantinoxidasa (XO, EC: 1.1.2.22).....	16
2.2	OBRANA PROTI OXIDAČNÍMU STRESU	17
2.2.1	Neenzymové faktory obrany proti oxidačnímu stresu.....	18
2.2.1.1	Vitamin E	18
2.2.1.2	Vitamin C	19
2.2.1.3	Karotenoidy.....	20
2.2.1.4	Glutathion.....	21
2.2.2	Enzymové faktory obrany oxidačního stresu	22
2.2.3	Katalasa	22
2.2.3.1	Monofunkční hemové katalasy (typické katalasy).....	24
2.2.3.2	Katalasy-peroxidasy	25
2.2.3.3	Katalasa obsahující mangan.....	26
2.2.4	Superoxiddismutasa.....	27
2.2.4.1	CuZn-SOD neboli SOD1	27
2.2.4.2	MnSOD neboli SOD2	27
2.2.4.3	EC-SOD neboli SOD3	28
2.2.4.4	FeSOD.....	28
2.2.5	Askorbátperoxidasa	28
2.3	SIGNÁLNÍ DRÁHY U VČEL NEBO ČMELÁKŮ, KTERÉ REAKTIVNÍ KYSLÍKOVÉ RADIKÁLY SPOUŠTÍ NEBO JE OVLIVŇUJÍ	29
2.3.1	NF-κB transkripční faktory	29
2.3.2	Antimikrobiální peptidy (AmP)	29
2.4	NEPŘÍZŇIVÉ VLIVY REAKTIVNÍCH KYSLÍKOVÝCH RADIKÁLŮ.....	30
2.4.1	Lipidická peroxidace	30
2.4.2	Karbonylace proteinů	31
2.5	VČELÍ PATOGENY A PARAZITI A JEJICH VLIV NA ZDRAVÍ VČEL A VČELSTEV.....	31
2.5.1	Parazitární onemocnění	32
2.5.1.1	Varroóza včel	32
2.5.1.2	Roztočiková nákaza včel.....	32
2.5.2	Bakteriózy včel.....	32
2.5.2.1	Mor včelího plodu	32
2.5.2.2	Hniloba včelího plodu	33
2.5.3	Virózy včel	33
2.5.4	Houbová onemocnění.....	34
2.5.4.1	Zvápenatění včelího plodu	34
2.5.4.2	Nosematóza.....	34
2.5.5	Vliv prostředí.....	35

2.6	METODY STANOVENÍ CELKOVÝCH KYSLÍKATÝCH RADIKÁLŮ A METODY MĚŘENÍ LIPIDICKÉ PEROXIDACE	35
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	37
3.1	MATERIÁL	37
3.1.1	Biologický materiál	37
3.1.2	Chemikálie.....	37
3.1.3	Přístrojové vybavení.....	38
3.2	METODY	38
3.2.1	Spektrofotometrické stanovení koncentrace proteinů	38
3.2.2	Spektrofotometrické stanovení aktivity katalasy.....	39
3.2.2.1	Příprava vzorků včel pro měření aktivity katalasy.....	39
3.2.2.2	Měření aktivity katalasy.....	39
3.2.3	Spektrofotometrické stanovení aktivity superoxiddismutasy.....	40
3.2.3.1	Příprava vzorků pro stanovení aktivity superoxiddismutasy	40
3.2.3.2	Spektrofotometrické stanovení aktivity superoxiddismutasy	41
3.2.4	Stanovení lipidické peroxidace.....	41
3.2.4.1	Stanovení kalibrační rovnice pro měření lipidické peroxidace.....	41
3.2.4.2	Příprava vzorků pro měření lipidické peroxidace	42
3.2.4.3	Obohacení vzorku o standard TEP, a jeho zpětné stanovení ve vzorku	42
3.2.4.4	Spektrofotometrické stanovení lipidické peroxidace	42
3.3	STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ	43
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	44
4.1	KALIBRACE PRO VÝPOČET KONCENTRACE PROTEINŮ	44
4.2	STANOVENÍ SPECIFICKÉ AKTIVITY ENZYMU KATALASY	45
4.2.1	Profil aktivity katalasy na včelách odebraných v různých měsících roku	45
4.2.2	Stanovení aktivity katalasy po <i>in vitro</i> imunizaci včel.....	48
4.3	STANOVENÍ SPECIFICKÉ AKTIVITY ENZYMU SUPEROXIDDISMUTASY.....	49
4.4	STANOVENÍ LIPIDICKÉ PEROXIDACE	53
4.4.1	Vývoj metodiky	53
4.4.2	Ověření pravdivosti měření koncentrace malondialdehydu v reálných vzorcích	55
4.4.3	Výsledky měření lipidické peroxidace	57
5	ZÁVĚR	59
6	LITERATURA.....	60
7	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	64

Cíle práce

Vypracovat literární rešerši o složkách antioxidačního systému hmyzu se zaměřením na včelu medonosnou (*Apis mellifera*)

Zpracování literární rešerše o vlivu patogenů a parazitů (*Nosema spp.*, *Varroa destructor*, viry a další) na fyziologické pochody včely medonosné se zaměřením na antioxidační stres.

Studium změn v antioxidačním systému včely medonosné.

1 ÚVOD

Včela medonosná (*Apis mellifera*) je jedním z nejvýznamnějších zástupců společenského hmyzu se sociální imunitou. Včely jsou důležitými opylovateli rostlin a také producenty včelích produktů, jako je med, propolis a vosk. Zdraví včel je jedním z velmi diskutovaných témat poslední doby. Na včely působí řada stresových faktorů, mezi ně patří řada bakteriálních, virových a houbových onemocnění. Dalšími faktory jsou například xenobiotika z průmyslových pesticidů a další látky, které vznikají lidskou činností. V důsledku jejich působení vzniká tzv. oxidační stres. Oxidační stres vzniká nahromaděním reaktivních forem kyslíku (tzv. ROS) (Kodrik et al., 2015).

Jako reaktivní formy kyslíku jsou označovány chemicky velmi reaktivní sloučeniny kyslíku, které se dělí na volné radikály s nepárovými elektrony a neradikálové formy, které sdílí jejich nepárové elektrony (Kodrik et al., 2015). Řadíme mezi ně například superoxidový anionradikál, hydroxylový radikál či peroxid vodíku. Souhrn je uveden v Tab. 1. Místem vzniku ROS jsou mitochondrie, peroxisomy či chloroplasty. Ke vzniku reaktivních forem kyslíku dochází i za fyziologických podmínek, různými enzymovými i neenzymovými reakcemi. Množství ROS je regulováno řadou antioxidantních enzymů a látek, které dohromady tvoří antioxidantní systém včely. Pokud se tvoří větší množství ROS, nežli může být detoxifikováno, hladina ROS se zvýší a může dojít k lipidické peroxidaci nebo k oxidačnímu poškození proteinů či nukleových kyselin. To vede ke ztrátě funkce těchto důležitých molekul (Weirich et al., 2002).

Tabulka 1 Reaktivní formy kyslíku

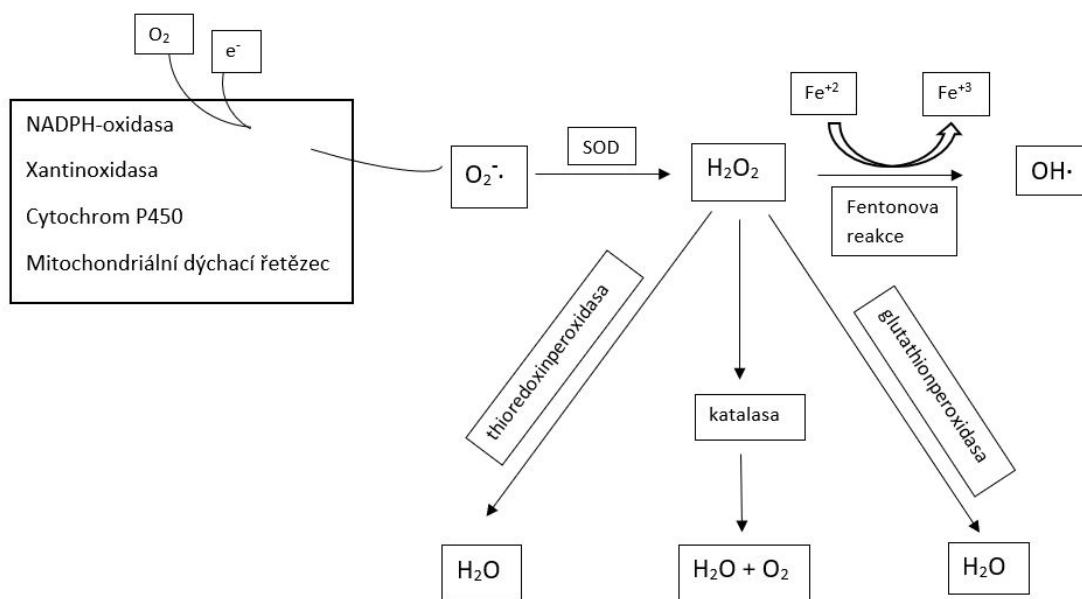
Název	Značka
superoxidový anionradikál	O^{2-}
peroxid vodíku	H_2O_2
hydroxylový radikál	$HO\cdot$
ozon	O_3
hydroxyperoxyl	$HO_2\cdot$
peroxylový radikál	$ROO\cdot$
singletový kyslík	1O_2

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Vznik reaktivních forem kyslíku

Reaktivní formy kyslíku jsou generovány aerobními organismy během běžného buněčného metabolismu. Vznikají především v organelách s vysokou metabolickou aktivitou a intenzivním aerobním metabolismem, jako jsou např. mitochondrie, peroxisomy, endoplasmatické retikulum, nebo pomocí enzymů v cytoplasmatické membráně. V nízké koncentraci hrají roli v některých fyziologických procesech, ovšem ve vysoké míře jsou cytotoxické (Halliwell a Gutteridge, 1999). Zdroje reaktivních forem kyslíku rozlišujeme na endogenní a exogenní. Endogenní zdroje poté můžeme rozdělit na enzymové a neenzymové (Kodrik *et al.*, 2015). Mezi tzv. exogenní zdroje ROS se řadí ionizující záření, pesticidy a reakce iontů těžkých kovů (Kodrik *et al.*, 2015). Ionizující záření dokáže hydroxylový, a i další organické radikály, přeměnit na peroxid vodíku a jiné peroxidy. Tyto peroxidy mohou následně reagovat s ionty kovů, mezi které patří Fe^{2+} a Cu^+ . Produktem této tzv. Fentonovy reakce jsou právě kyslíkové radikály (Biaglow *et al.*, 1992). Těžkými kovy, které mohou reagovat, jsou rtuť, nikl, olovo či kadmium. Oxidační stres může být generován pesticidy a dalšími xenobiotiky. Jednou z látek s takovými účinky je herbicid paraquat (Li-Byarlay *et al.*, 2016).

Mezi endogenní zdroje ROS patří zejména mitochondriální elektronový transportní řetězec, NADPH-oxidasa lokalizovaná v cytoplasmatické membráně, cytochrom P450 monooxygenasa a xantinoxidasa v peroxisomech (Obr. 1) (Granger, 1988). U včel jsou ROS ve velkém množství produkovány v létacích svalech, které se nacházejí v hrudníku (thoraxu) včely.



Obrázek 1 Schéma vzniku a inaktivace ROS - upraveno dle (Forstermann a Munzel, 2006)

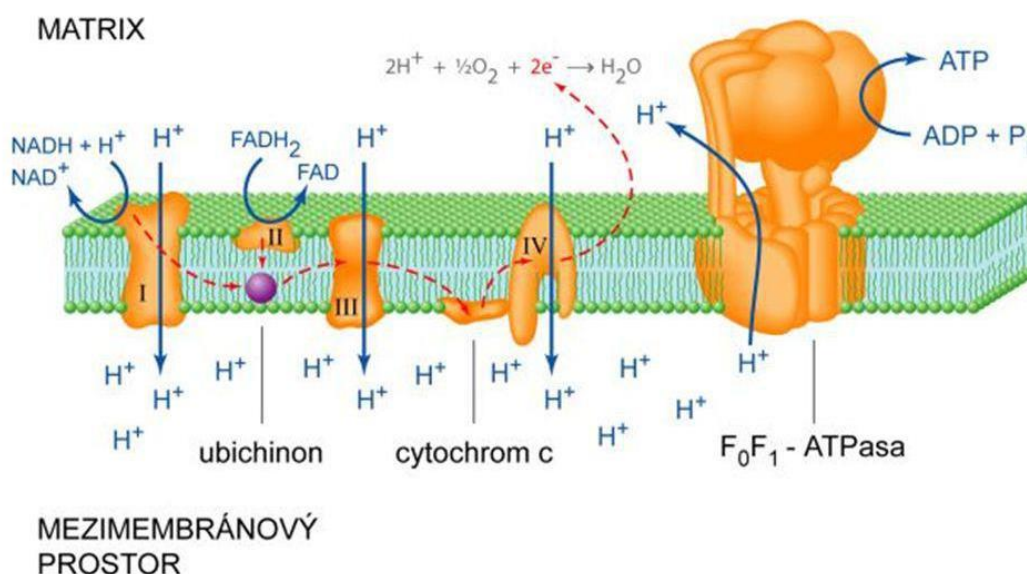
2.1.1 Zdroje ROS

2.1.1.1 Mitochondrie

Mitochondrie jsou buněčné organely aerobních živočichů, důležité pro metabolismus buněk. Součástí mitochondrií je i dýchací řetězec, který je lokalizován na membráně mitochondrie (Obr. 2) (Fridovich, 2004). V rámci dýchacího řetězce probíhají redoxní reakce, při kterých se hromadí energie a díky ní dochází k přenosu protonů do mezimembránového prostoru (Miwa *et al.*, 2008). Vzniká protonový gradient, jenž pohání ATPasu při syntéze adenosintrifosfátu (ATP). Během tvorby ATP jsou elektrony přenášeny pomocí elektronového transportního řetězce. Tyto elektrony slouží k redukci kyslíku na vodu. Během tohoto procesu 1-3 % elektronů díky slabým přenašečům opustí systém a zapříčiní produkci superoxidového anion radikálu (Fridovich, 2004, Miwa *et al.*, 2008). Ve vnitřní mitochondriální membráně jsou zakotveny komplexy, které patří k elektronovému transportnímu řetězci. Jedná se o reduktasy a jsou celkově čtyři (Tab. 2).

Tabulka 2 Seznam membránových komplexů

Komplex I	NADH-Q oxidoreduktasa
Komplex II	sukcinát-Qreduktasa
Komplex III	Q-cytochrom c oxidoreduktasa
Komplex IV	cytochrom c oxidasa



Obrázek 2 Schéma mitochondriálního dýchacího řetězce – převzato z (Kodíček, 2018)

Hlavní zdroje superoxidu v mitochondriích savců jsou NADH oxidoreduktasa (komplex I) a cytochrom c oxidoreduktasa (komplex III) (Forstermann a Munzel, 2006). Ovšem bylo dokázáno, že určité mutace mohou přeměnit komplex II na generátor superoxidů. Příkladem takové mutace, je mutace vedoucí k substituci glycinu za glutamovou kyselinu v cyt-1 (Ishii *et al.*, 1998). Enzym glycerol-3-fosfátdehydrogenasa se ukázal být jako účinný zdroj superoxidů v mitochondriích *D. melanogaster* (octomilka obecná). Mechanismus je takový, že komplex I uvolní superoxid směrem k matrix mitochondrii, kde je lokalizován komplex III a glycerol-3-fosfátdehydrogenasa. Ty uvolňují superoxid do matrix a také do cytoplasmy (Miwa *et al.*, 2008). Na matrix mitochondriích je také manganová superoxiddismutasa, která odstraňuje superoxidové anionradikály a generuje peroxid vodíku. Ten může být konvertovaný pomocí dalších enzymů na vodu a kyslík. Pokud ovšem není peroxid rozložen, může reagovat s Fe^{2+} a těžkými kovy a produkovat reaktivní hydroxylové radikály (Tang *et al.*, 2014).

2.1.2 Enzymy jako zdroje ROS

2.1.2.1 NADPH-oxidasa (Nox, EC: 1.6.3.1)

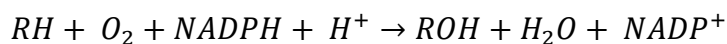
NADPH-oxidasa (NOX) je transmembránový enzym, který byl původně identifikován ve fagocytech (Bedard a Krause, 2007). Tento enzym má více isoform - Nox1, Nox3, Nox4, Nox5 a Duox1, Duox5 – což jsou fagocytární isoformy, a Nox2, který byl objeven ve velkém množství různých dalších buněk a tkání (Cheng *et al.*, 2001), např. i v nervové soustavě (Choi *et al.*, 2005). NADPH-oxidasa byla prvním objeveným případem enzymového systému, jehož výhradní funkcí je produkce ROS. Katalyzuje jednoelektronovou redukci kyslíku, čímž vzniká superoxidový radikál (rovnice 1) (Tang *et al.*, 2014). Iniciací fagocytózy může nastat po napadení buňky patogenem, čímž dochází ke stimulaci membránově vázané Nox. Dochází k toku elektronů z cytosolárního kofaktoru NADPH k extracelulárnímu kyslíku a tvorbě superoxidů. Superoxid může být modifikován na jiné metabolity (Racek a Holecek, 1999).



Rovnice 1 Jednoelektronová redukce kyslíku

2.1.2.2 Cytochrom P450 (P450 nebo CYP)

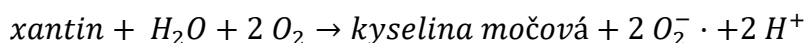
Cytochrom P450 monooxygenasy jsou hemoproteinové enzymy, které mají klíčovou roli v primárních i sekundárních metabolických drahách. Jsou to enzymy, které se obecně podílejí na metabolismu endogenních látek. Katalyzují rozmanité reakce, například hydroxylaci, sulfoxidaci či epoxidaci. Tyto enzymy obsahují tetrapyrrolové jádro s centrálním atomem železa. Vyskytují se v membránových strukturách endoplasmatického retikula (ER) a mitochondrií (Lamb a Waterman, 2013). Cytochromy P450 katalyzují monooxygenasové reakce prostřednictvím vazby s enzymem NADPH:cytochrom P450 reduktasou či dalšími enzymy. Reakce se účastní molekula kyslíku O₂. Elektrony z NADPH jsou přenášeny na NADPH:cytochrom P450 reduktasu a poté na cytochromy P450. Redukovaná forma cytochromu P450 aktivuje molekulu O₂, která se štěpí na dva atomy. Jeden atom kyslíku je začleněn do substrátu, zatímco druhý atom kyslíku reaguje s protony vodíku za vzniku vody (rovnice 2) (Stiborova *et al.*, 1999). Pokud jsou elektrony přenášeny na jiné akceptory (např. O₂), dochází k produkci kyslíkových radikálů (Peng *et al.*, 2017).



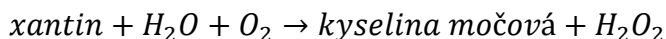
Rovnice 2 Reakce cytochromu P450

2.1.2.3 Xantinoxidasa (XO, EC: 1.1.2.22)

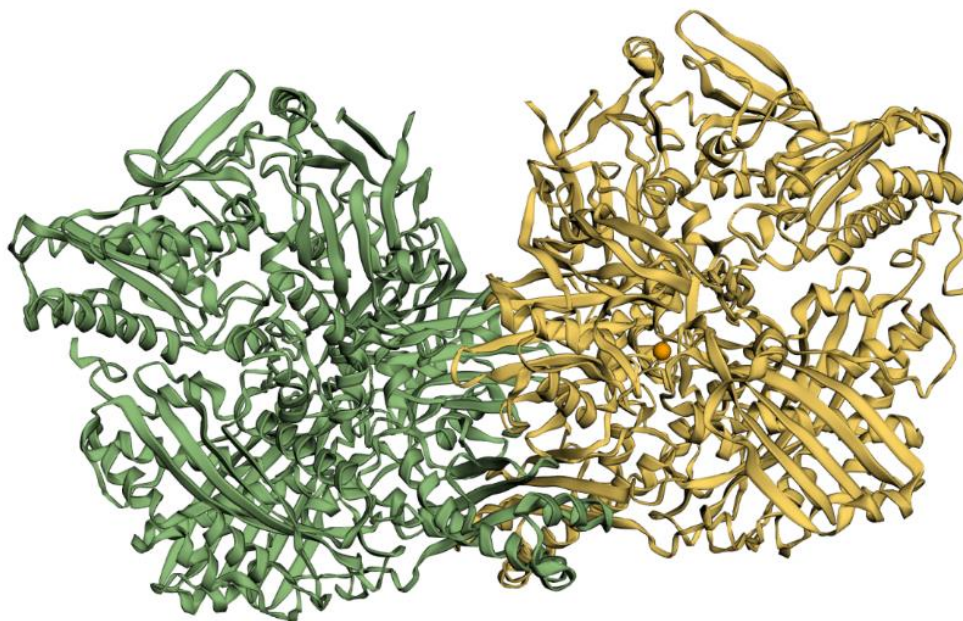
Xantinoxidasa je jednou z forem xantinoxidoreduktas. XO je homodimer obsahující jedno molybdenové centrum, dvě FeS centra a kofaktor FAD (Obr. 3). Tento enzym je generován proteolýzou xantindehydrogenasy či oxidací sulfhydrylové skupiny a je umístěn v játrech, střevech či v séru (He *et al.*, 2019). XO je řazena mezi zdroje ROS, protože katalyzuje oxidaci hypoxantinu na xantin. Při této reakci xantinoxidasa daruje elektrony molekulárnímu kyslíku O₂, čímž tvoří kyslíkové radikály jako například superoxidový anionradikál (Ohara *et al.*, 1993). Vznikající xantin může být za katalýzy xantinoxidasou oxidován na kyselinu močovou (Tang *et al.*, 2014). Dalším produktem je mimo jiné peroxid vodíku, který se také řadí mezi ROS (Ohara *et al.*, 1993) (rovnice 3 a 4). Mezi další funkce XO se řadí katabolismus xenobiotik jako část detoxifikačního procesu (Cooper *et al.*, 2006).



Rovnice 3 Tvorba superoxidového anionradikálu xantinoxidasou



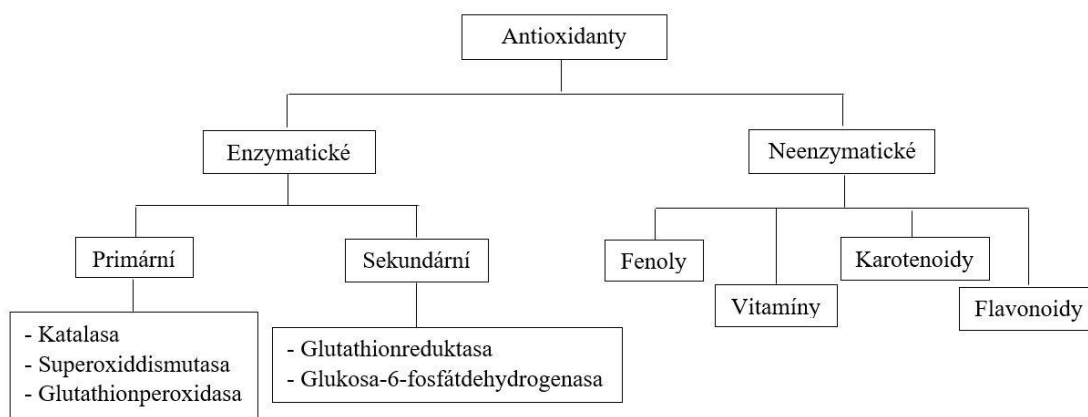
Rovnice 4 Tvorba peroxidu vodíku xantinoxidasou



Obrázek 3 Trojrozměrný model xantinoxidasy (vytvořeno v programu PyMOL)

2.2 Obrana proti oxidačnímu stresu

Jako obrana proti oxidačnímu stresu slouží řada enzymových, ale i neenzymových faktorů. Je to řada sloučenin, které nazýváme antioxidanty. Antioxidanty jsou nízkomolekulární látky, jichž molekuly vychytávají reaktivní radikály, případně je převádí do méně reaktivních stavů. Definice dle Halliwella (2007) udává, že antioxidanty jsou jakékoliv látky, které zpomalují, zabraňují či odstraňují účinky oxidačního poškození jiných molekul (Denisov a Afanas'ev, 2005). Antioxidačně aktivní mohou být látky několika způsoby. Látky mohou inhibovat radikálové oxidační reakce, zhaset singletové kyslíky nebo mohou být inhibitory prooxidačních enzymů. Antioxidanty dělíme na neenzymové a enzymové ochranné systémy (Obr. 4). Neenzymové ochranné systémy jsou například askorbát, glutathion či karotenoidy. Mezi enzymové ochranné systémy patří superoxiddismutasa (SOD, EC: 1.15.1.1), glutathionperoxidasa, myeloperoxidasa, katalasa (CAT, EC: 1.11.1.6) a peroxidasy (Carocho a Ferreira, 2013).



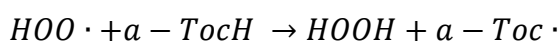
Obrázek 4 Schéma rozdělení antioxidantů

2.2.1 Neenzymové faktory obrany proti oxidačnímu stresu

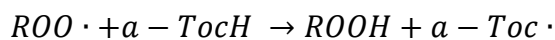
Neenzymové antioxidanty jsou látky o malé molekulové hmotnosti, které mohou tvořit řadu následných reakcí jako odpověď na kyslíkové radikály. Mezi neenzymové faktory patří endogenní látky a také složky potravy. Nejznámějšími a nejúčinnějšími přírodními antioxidanty jsou tokoferol (vitamin E) a kyselina askorbová (vitamin C). Další látky s antioxidantními účinky jsou například kyselina močová a nenasycené mastné kyseliny či karotenoidy (Felton a Summers, 1995).

2.2.1.1 Vitamin E

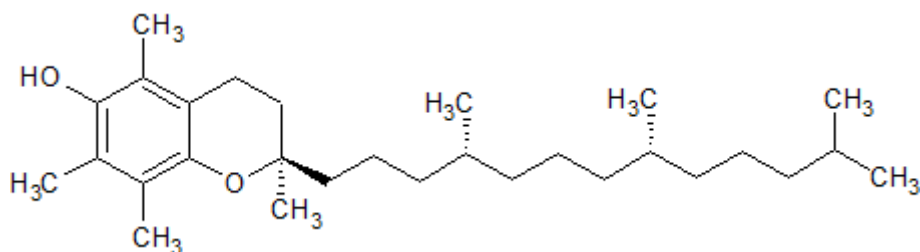
Vitamin E je tvořen skupinou čtyř tokoferolů a čtyř tokotrienolů. Nejvyšší účinnost z této skupiny na biologický systém má α -tokoferol. Tokoferoly jsou fenolické deriváty 6-hydroxychromonu s velmi reaktivní hydroxylovou skupinou, která je zodpovědná za dobré antioxidantní vlastnosti této látky. Jsou rozpustné v tucích (Ledvina *et al.*, 2009). Tento vitamin je velmi reaktivní v přítomnosti $\text{HOO}\cdot$ a $\text{ROO}\cdot$ radikálů, které deprotonizují α -tokoferol (rovnice 5 a 6). Tokoferoly brání peroxidaci lipidů poskytnutím fenolického vodíku peroxylovému radikálu. Tím se z tokoferolu stává radikál, který je ovšem velmi nereaktivní a neschopný dále pokračovat v oxidační reakci. Tokoferol se při vysoké koncentraci může stát také prooxidantem (Denisov a Afanas'ev, 2005).



Rovnice 5 Reakce tokoferolu s hydroperoxylovým radikálem (Denisov a Afanas'ev, 2005)



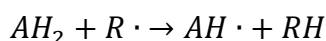
Rovnice 6 Reakce tokoferolu s peroxylovým radikálem (Denisov a Afanas'ev, 2005)



Obrázek 5 Strukturní vzorec α -Tokoferolu

2.2.1.2 Vitamin C

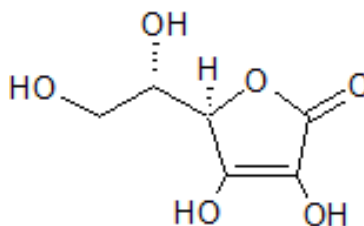
Vitamin C, neboli kyselina askorbová (Obr. 6), je velmi rozšířený antioxidant (rovnice 7), který je přijímán z rostlinné potravy. Je to důležitý vitamín pro hmyz a některé druhy zvířat. Kyselina askorbová obsahuje dvě sloučeniny s antioxidačními účinky, a to L-askorbovou kyselinu a L-dehydroaskorbovou kyselinu. Má velmi aktivní hydroxylovou skupinu (Carocho a Ferreira, 2013). Vitamin C je efektivní při zhášení superoxidových radikálových aniontů, hydroxylových radikálů, singletových kyslíků či při vychytávání peroxidu vodíku. Na druhou stranu má kyselina askorbová i redukční vlastnosti, kdy snadno redukuje železité ionty na železnaté ve Fentonově reakci, při které vznikají hydroxylové radikály a hydroxidové anionty (rovnice 8) (Denisov a Afanas'ev, 2005).



Rovnice 7 Antioxidační účinky kyseliny askorbové (Denisov a Afanas'ev, 2005)



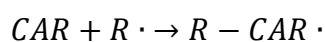
Rovnice 8 Prooxidační účinky kyseliny askorbové (Denisov a Afanas'ev, 2005)



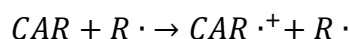
Obrázek 6 Strukturální vzorec kyseliny askorbové

2.2.1.3 Karotenoidy

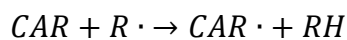
Karotenoidy jsou skupinou přírodních pigmentů, které jsou syntetizovány rostlinami a mikroorganismy. Karotenoidy podobně jako tokoferoly reagují s ROS a tím se řadí mezi antioxidanty (Denisov a Afanas'ev, 2005). Jsou známy nejméně tři mechanismy, kterými mohou karotenoidy reagovat s kyslíkovými radikály. Patří mezi ně radikálová adice, kdy peroxylový radikál může být adován na kterékoliv místo polyenního řetězce (rovnice 9). Druhým mechanismem je transfer elektronů za vzniku kationtových či aniontových radikálů karotenů (rovnice 10). Třetím mechanismem je odebrání vodíku z karotenoidů (rovnice 11) (Krinsky a Yeum, 2003). Mezi karotenoidy s antioxidačními účinky patří například β -karoten (Obr. 7) či lykopen (Denisov a Afanas'ev, 2005). Antioxidační vlastnosti této látky jsou dány její strukturou. Karoteny jsou hydrokarbony se specifickou koncovou skupinou. Obsahují také systém konjugovaných dvojných vazeb, který díky delokalizaci elektronů může rychleji absorbovat energii excitovaných molekul. Děje se tak díky ataku radikálů, za současného štěpení molekul karotenoidu a stabilizaci radikálu (Young a Lowe, 2001). Stabilizace radikálu je podporována přítomností dalších antioxidantů, jako jsou vitamin E a vitamin C, a také antioxidačními enzymy (Bohm *et al.*, 1997).



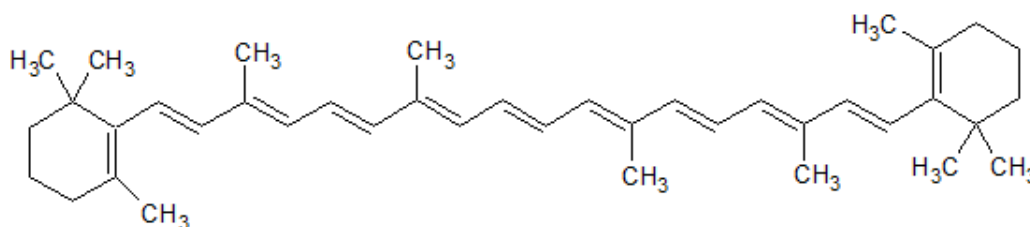
Rovnice 9 Mechanismus reakce karotenoidu (CAR) s radikálem ($R\cdot$) - adice radikálu na karotenoid (převzato z (Krinsky a Yeum, 2003))



Rovnice 10 Mechanismus reakce karotenoidu (CAR) s radikálem ($R\cdot$) – transport elektronů (převzato z (Krinsky a Yeum, 2003))



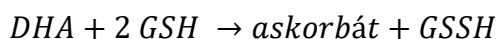
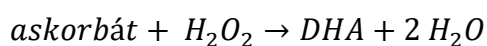
Rovnice 11 Mechanismus reakce karotenoidů (CAR) s radikálem ($R\cdot$) – odběr vodíku (převzato z (Krinsky a Yeum, 2003))



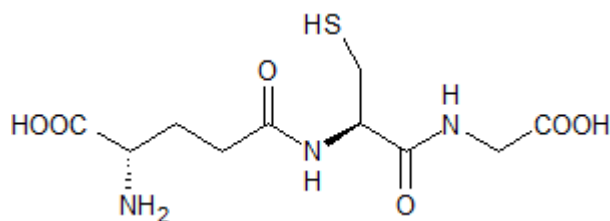
Obrázek 7 Strukturální vzorec β -karotenu

2.2.1.4 Glutathion

Glutathion je endogenní tripeptid s antioxidačními účinky, který chrání buňku před volnými radikály. Chrání ji výměnou vodíkového atomu nebo elektronu s reaktivní molekulou. Glutathion (Obr. 8) je velmi důležitý pro regeneraci některých dalších antioxidantů – například askorbátu (Steenvoorden a van Henegouwen, 1997). V rámci askorbát-glutathionového cyklu reaguje askorbát s peroxidem vodíku za tvorby dehydroaskorbátu (DHA). Dehydroaskorbát je následně převeden zpět na askorbát přijmutím elektronů z redukovaného glutathionu (GSH). Tyto reakce jsou popsány níže (rovnice 12). Redukci peroxidu urychluje enzym askorbátperoxidasa a druhá reakce může probíhat za přítomnosti dehydroaskorbátreduktasy (Barbehenn *et al.*, 2001). Vznikající dimer glutathionu (GSSG) je redukován zpět na glutathion pomocí enzymu glutathionreduktasy (Carocho a Ferreira, 2013).



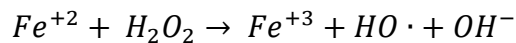
Rovnice 12 Reakce askorbát-glutathionového cyklu (Barbehenn *et al.*, 2001)



Obrázek 8 Strukturální vzorec glutathionu

2.2.2 Enzymové faktory obrany oxidačního stresu

Enzymové antioxidanty se dělí na dvě skupiny – primární a sekundární. Primární enzymová obrana je složena ze tří důležitých enzymů, které buď brání tvorbě radikálů, nebo neutralizují volné radikály. Jedním z nich je glutathionperoxidasa, která poskytuje dva elektrony k redukci peroxidu. Tím se peroxid nemůže stát substrátem pro Fentonovu reakci (rovnice 13) (Kodrik *et al.*, 2015). Dalšími primárními enzymy jsou superoxiddismutasa a katalasa. Sekundární enzymová obrana zahrnuje glutathionreduktasu a glukosa-6-fosfátdehydrogenasu. Pomocí těchto enzymů nedochází k přímé neutralizaci volných radikálů, ale mají podpůrnou funkci pro ostatní endogenní antioxidanty. Například glutathionreduktasa redukuje antioxidant glutathion z jeho oxidované formy na redukovanou, tím ho recykluje. Glukosa-6-fosfátdehydrogenasa regeneruje koenzym NADPH (Denisov a Afanas'ev, 2005).

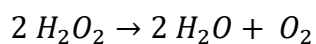


Rovnice 13 Fentonova reakce - rozklad peroxidu vodíku (Kodrik *et al.*, 2015)

2.2.3 Katalasa

Katalasa (CAT, EC: 1.11.1.6) je enzym vyskytující se v téměř všech organismech s aerobním metabolismem. Tento enzym je složen ze čtyř identických podjednotek a jeho celková molekulová hmotnost je 240 kDa (Mates *et al.*, 1999). Katalasa chrání buňku před katabolismem tvořenými molekulami s vysoce reaktivní peroxidickou vazbou. Zabráňuje vytvoření hydroxylového radikálu tím, že rozštěpí peroxid vodíku na vodu a kyslík (rovnice 14) (Denisov a Afanas'ev, 2005). Je známo více než 300 isoform katalas, které náleží do jedné z podskupin (Chelikani *et al.*, 2004). Tyto podskupiny jsou tři – monofunkční katalasy (Obr. 9), katalasy-peroxidasy a katalasy obsahující mangan. Monofunkční (dříve označované jako typické katalasy) a katalasy-peroxidasy (Obr. 10) obsahují hemovou skupinu, zatímco mangan obsahující katalasy (Obr. 11) jsou označovány za nehemové katalasy. Hemové katalasy jsou jedny z mála enzymů, jejíž prostetická skupina dokáže katalyzovat stejnou reakci jako holoenzym (Zamocky a Koller, 1999). Mechanismus rozkladu peroxidu vodíku je společný pro hemové katalasy a je rozdělen na dva kroky. Nejdříve molekula peroxidu oxiduje hem na oxyferrylovou formu a odstraněním oxidačních ekvivalentů vzniká porfyrinový kationradikál. Druhá

molekula peroxidu je využívána jako redukční činidlo pro takto vzniklý porfyrinový meziprodukt, kdy se současně regeneruje enzym a vzniká voda a kyslík (Chelikani *et al.*, 2004).

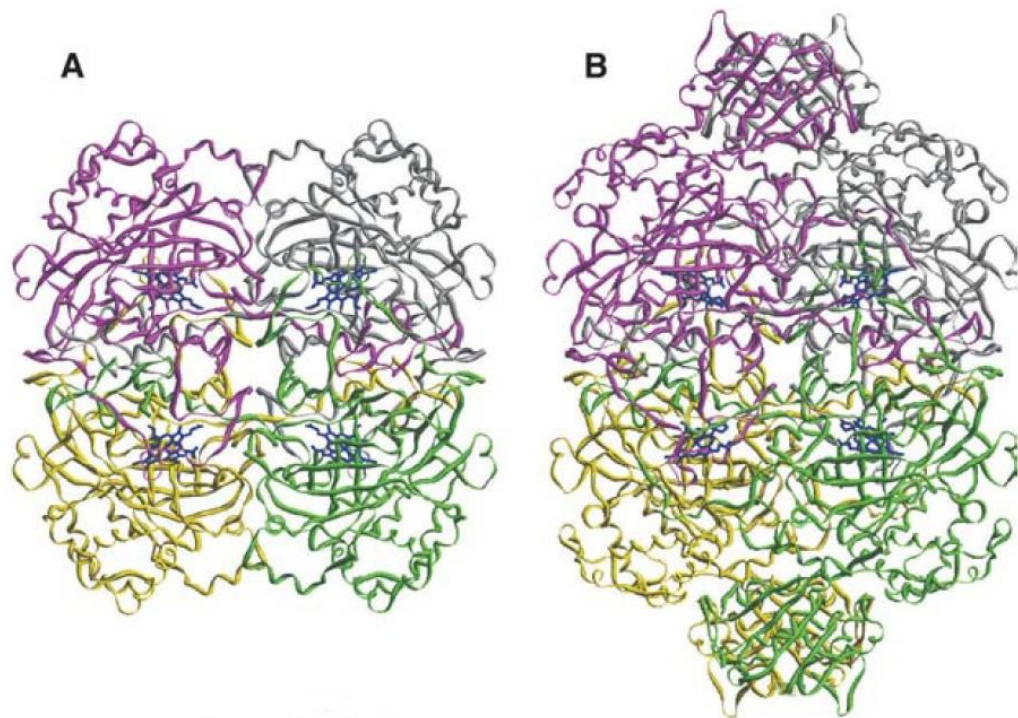


Rovnice 14 Rozklad peroxidu vodíku (Denisov a Afanas'ev, 2005)

Katalasa je kódovaná v genomu včely na 6. chromosomu, primární sekvence enzymu má 513 aminokyselin. Katalasa je lokalizována v cytosolu buněk. Katalasová aktivita byla zjištěna i v medu, což slouží k udržení hladiny peroxidu vodíku v medu pod hranicí toxicity (Corona a Robinson, 2006).

2.2.3.1 Monofunkční hemové katalasy (typické katalasy)

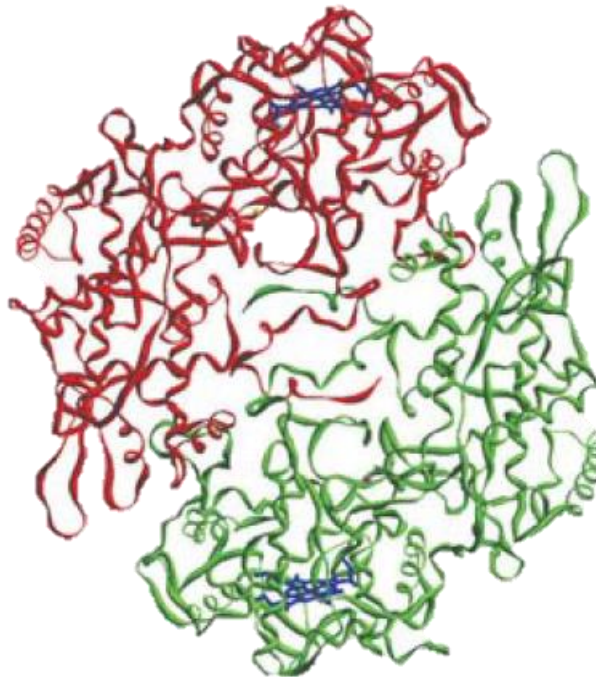
Většina těchto hydroperoxidas jsou homotetramery o velikosti 200–340 kDa, složené ze čtyř prostetických hemových skupin. Katalasy patřící do této skupiny jsou obsaženy v téměř veškerých aerobně dýchajících organismech, jak prokaryotách tak i eukaryotách. Dosud ale nebyla nalezena u organismů patřících do domény Archae (Chelikani *et al.*, 2004). Většina rostlin obsahuje dokonce více isoform tohoto enzymu. Monofunkční CAT mají vysokou katalytickou aktivitu. Tyto enzymy jsou také schopny katalyzovat dvouelektronovou peroxidaci alifatických alkoholů. Podjednotky jsou chráněny před poškozením navázaným kofaktorem NADPH (Zamocky a Koller, 1999).



Obrázek 9 Terciární struktura katalasy A) tetramerní malé podjednotky Hem-obsahující katalasy, B) tetramerní velké podjednotky Hem-obsahující katalasy. V obou případech je Hem znázorněn modrou barvou (převzato z (Chelikani *et al.*, 2004))

2.2.3.2 Katalasy-peroxidasy

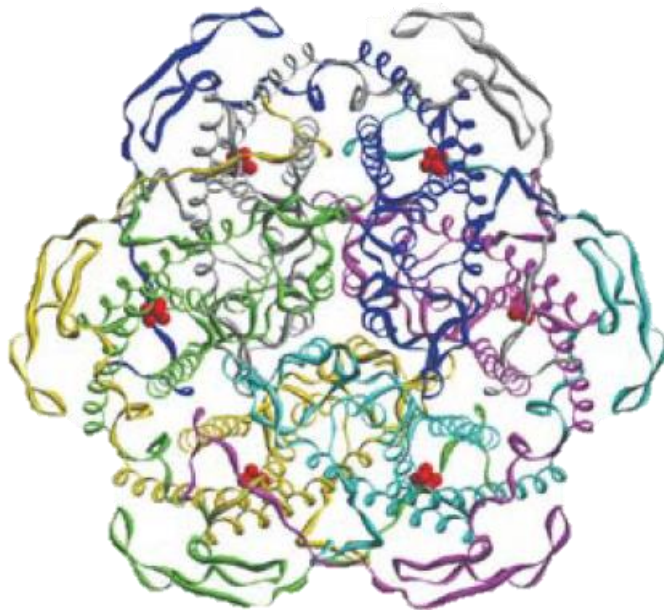
Katalasy patřící do této skupiny se vyskytují ve všech třech doménách – prokaryota, archea i eukaryota. Molekulová hmotnost těchto většinou homodimerních enzymů je mezi 120–340 kDa. Tyto enzymy jsou složeny z více než 700 aminokyselin a obsahují hemovou skupinu. Degradace peroxidu vodíku tedy probíhá dvoukrokovým mechanismem (Zamocky a Koller, 1999). Katalasy-peroxidasy mají bifunkční chování, kdy v přítomnosti vhodného elektronového dárce a při nízké hladině peroxidu vodíku začíná převažovat peroxidasová reakce (Chelikani *et al.*, 2004).



Obrázek 10 Terciární struktura dimerní katalasy-peroxidasy. Hemové skupiny jsou znázorněny modrou barvou (převzato z (Chelikani *et al.*, 2004))

2.2.3.3 Katalasa obsahující mangan

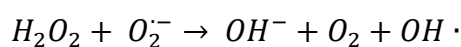
Skupina těchto katalas patří do nehemové skupiny. Tyto enzymy nejsou příliš rozšířené, dosud byly objeveny pouze u několika bakterií. Molekulová hmotnost objevených katalas patřících do této skupiny se pohybuje mezi 170 a 210 kDa (Zamocky a Koller, 1999). Tyto enzymy mají oligomerní strukturu – homopentamery či homohexamery. Někdy jsou tyto enzymy nazývány pseudokatalasami, protože neobsahují hemovou skupinu. Jsou rozdílné, protože na rozdíl od hemových katalas nemohou být inhibovány kyanidovými a nitridovými anionty (Zamocky a Koller, 1999).



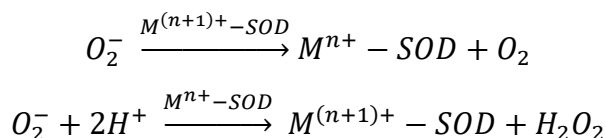
Obrázek 11 Terciární struktura hexamerní dimanganaté katalasy. Manganové skupiny jsou znázorněny červeně (převzato z (Chelikani *et al.*, 2004))

2.2.4 Superoxiddismutasa

Superoxiddismutasa (SOD, EC: 1.15.1.1) je jeden z důležitých antioxidačních enzymů. Superoxiddismutasy jsou schopny dismutovat superoxid na peroxid vodíku a kyslík (Denisov a Afanas'ev, 2005). Superoxidový aniont je produkován jedoelektronovou redukcí kyslíkaté molekuly. Tento aniont iniciuje radikálovou řetězovou reakci (Fujii *et al.*, 2005). Jeho toxicita spočívá v interakci s peroxidem vodíku za tvorby vysoce reaktivního hydroxylového radikálu OH· (rovnice 15). Tyto radikály mohou poškozovat DNA, lipidy či proteiny (Tsang *et al.*, 1991). Mechanismus dismutace superoxidu je popsán uvedenými poloreakcemi (rovnice 16) (Skalicka *et al.*, 2012).



Rovnice 15 Reakce superoxidového aniontu s peroxidem vodíku (Tsang *et al.*, 1991)



Rovnice 16 Mechanismus dismutace superoxidového aniontu na peroxid vodíku, kdy buď M = Cu tak n = 1 nebo M = Mn kdy n = 2 (Skalicka *et al.*, 2012)

Vzniklý peroxid vodíku je poté rozkládán pomocí enzymu katalasy. Jsou známy čtyři isoformy SOD, které jsou rozlišovány podle toho, jaký kovový kofaktor obsahují. Obsah se liší v cytosolové a mitochondriální SOD. Zatímco cytosolová SOD obsahuje měď a zinek, v mitochondriální SOD se nachází mangan. (Tsang *et al.*, 1991).

2.2.4.1 CuZn-SOD neboli SOD1

Tato isoforma obsahuje měď nebo zinek jako svůj kovový kofaktor. Má molekulární hmotnost přibližně 32 kDa a vyskytuje se jako homodimer. Kromě cytoplasmy se vyskytuje také v jádru buněk a v lysozomech (Zelko *et al.*, 2002).

2.2.4.2 MnSOD neboli SOD2

Manganová isoforma se vyskytuje v prokaryotech, ale také v mitochondriích eukaryot. Tento enzym existuje jako homotetramer s molekulární hmotností jednotlivých podjednotek rovnající se 23 kDa (Zelko *et al.*, 2002).

2.2.4.3 EC-SOD neboli SOD3

EC isoforma je extracelulární a má podobnou strukturu jako CuZn-SOD. Také obsahuje měď a zinek jako kofaktory. Tento enzym existuje jako homotetramer s molekulární hmotností 135 kDa, a navíc má vysokou afinitu k heparinu (Zelko *et al.*, 2002).

2.2.4.4 FeSOD

Železnatá isoforma byla objevena u cyanobakterií a jiných prokaryot, jako i v plastidech některých rostlin (Wolfe-Simon *et al.*, 2006).

2.2.5 Askorbátperoxidasa

Askorbátperoxidasa (APX, EC: 1.11.1.11) je antioxidační enzym, který je u hmyzu používán pro udržování hladiny peroxidu vodíku. Tento enzym patří do rodiny peroxidas, které obsahují hem. Má více isoform, které se dělí podle toho, kde v buňce se nachází. Tyto isoformy jsou popisovány převážně u rostlin (Anjum *et al.*, 2016). APX redukuje peroxid vodíku a vznikající dehydroaskorbát je poté přeměněn zpět na askorbát díky působení dehydroaskorbátreduktasy. Pro tuto transformaci slouží glutathion (GSH) jako donor elektronů a vzniká dimer glutathionu GSSG (rovnice 12) (Carocho a Ferreira, 2013). Askorbát sám dokáže odstraňovat peroxid vodíku neenzymatickou cestou, ale enzymatické děje jsou efektivnější. Zde askorbát slouží jako donor elektronů, a to nejen u hmyzu ale také u savců a rostlin. Kvůli absenci selen-dependentní glutathionperoxidasy a nízké efektivitě katalasy při odstraňování málo koncentrovaného peroxidu vodíku, je tento enzym pro hmyz velmi důležitý (Mathews *et al.*, 1997).

APX aktivita byla ve studii od autorů Mathews *et al.*, z roku 1997 detekována v homogenátech těl černopásky bavlníkové (*Helicoverpa zea*). Tento enzym nemá APX aktivitu pouze vůči peroxidu vodíku, ale také na dva modely lipofilních peroxidů, a to kumenhydroperoxid a t-butyl hydroperoxid. To naznačuje, že askorbátperoxidasa by mohla být důležitá při odstraňování lipidických peroxidů z těl hmyzu. Důležitá je také aktivita askorbátperoxidasy v trávicím traktu, kde je odstraňován peroxid vodíku přijímaný do těla společně s potravou (Mathews *et al.*, 1997).

2.3 Signální dráhy u včel nebo čmeláků, které reaktivní kyslíkové radikály spouští nebo je ovlivňují

ROS hrají velké množství signálních rolí v organismech od bakterií až po savce. ROS byly dříve považovány pouze za toxické vedlejší produkty reakcí, ale nyní jsou uznávány jako signální molekuly v komplexní signální síti. Velká výhoda využití ROS jako signálních molekul spočívá v tom, že existuje mnoho typů kyslíkových radikálů s různými vlastnostmi (Mittler *et al.*, 2011). U hmyzu není tato jejich role tak dobře prozkoumána jako je jejich úloha při eliminaci patogenů.

2.3.1 NF- κ B transkripční faktory

NF- κ B (nuclear factor- κ B) proteiny jsou jednou rodinou transkripčních faktorů, které mají klíčovou roli v imunitním systému. NF- κ B hrají důležitou roli i v dalších procesech, jako je růst, proliferace a přežití buňky. Tyto transkripční faktory jsou aktivovány fosforylačně-indukovanou proteosomální degradací inhibitoru I κ B, který zachovává neaktivní dimery NF- κ B v cytosolu nestimulovaných buněk. Aktivita typických I κ B inhibitorů je kontrolována fosforylací pomocí I κ B kinas (Reynaert *et al.*, 2006). Reaktivní formy kyslíku interagují s těmito transkripčními faktory hned několika způsoby, které jsou často protichůdné. NF- κ B regulační geny jsou důležitou součástí regulace množství ROS v buňce, ale na druhou stranu mají ROS inhibiční či stimulační funkci v NF- κ B signalizaci. Jednou z cest, kdy NF- κ B aktivita ovlivňuje hladinu ROS v buňce je, když zvyšuje expresi antioxidantních proteinů (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).

2.3.2 Antimikrobiální peptidy (AmP)

ROS ovlivňují i dráhy pro expresi antimikrobiálních peptidů, a to přes již zmíněný NF- κ B transkripční faktor v IMD dráze (Brutscher *et al.*, 2015). Antimikrobiální peptidy jsou jednou z obranných složek organismů vůči patogenům. Jejich zvýšená exprese je stimulována infekcí. Po nakažení včel bakterie pronikají do hemocoelu a stimulují syntézu a vyplavení AmP do hemolymfy. Tyto dráhy jsou aktivovány například lipopolysacharidy, peptidoglykany a β -1,3-glukany z buněčné stěny bakterií

(Randolt *et al.*, 2008). Hmyzí antimikrobiální peptidy se skládají z méně než 50 aminokyselin. U infekčních jedinců včely medonosné (*A. mellifera*) byly v hemolymfě nalezeny AmP abaecin, apidaecin, hymenoptaecin a defensin. V mateřích kašičkách byly nalezeny royalisin a jelleiny, a ve včelím jedu byl detekován antimikrobiální peptid mellitin (Daníhlik *et al.*, 2015).

2.4 Nepříznivé vlivy reaktivních kyslíkových radikálů

Řada studií prokázala, že kyslíkové radikály mají potenciál k indukci poškození různých buněčných komponent a mohou znehodnotit řadu biologicky důležitých molekul, jako jsou lipidy, proteiny či DNA (Miwa *et al.*, 2008). Tvorba ROS je jedním z důležitých patogenních mechanismů některých nemocí. Oxidační modifikace hrají roli u rozvoje nemocí jako je ateroskleróza, artritida, *diabetes mellitus*, ale také u patologických jevů jako je stárnutí, menopauza atd (Tan *et al.*, 2018). Mezi modifikace způsobené kyslíkovými radikály patří lipidová peroxidace, karbonylace proteinů a poškození DNA. Některé proteinové modifikace indukované ROS mohou vést k rozpletení či úpravě proteinové struktury, což může vést k poškození funkce molekuly nebo i celé buňky (Baltacıoğlu *et al.*, 2008).

2.4.1 Lipidická peroxidace

Lipidická peroxidace je řetězová reakce, ve které radikály s uhlíkovým centrálním atomem, umístěným na mastné kyselině, reagují s molekulárním kyslíkem. Touto reakcí vzniká peroxylový radikál ROO· (Miwa *et al.*, 2008). Lipidická peroxidace se může rozvíjet jak enzymatickou, tak i neenzymatickou cestou. Enzymatická peroxidace je katalyzována enzymy jako je lipoxygenasa či cyklooxygenasa. Neenzymatická peroxidace je iniciována hydroxylovými a superoxidovými radikály, fagocyty a xenobiotiky (Denisov a Afanas'ev, 2005). Lipidická peroxidace membrán má okamžitý účinek, kdy snižuje fluiditu membrány, a naopak zvyšuje propustnost těchto membrán pro ionty. Iontový gradient hraje velkou roli v mnoha fyziologických procesech, jako je například energetický metabolismus ve vnitřní membráně mitochondrií. Vysoký stupeň lipidické peroxidace může vést až ke ztrátě vlastností a funkce membrány, lýzi buněk, a dokonce až k buněčné smrti. Ke zmírnění lipidické peroxidace je potřebné dostatečné množství vitamínu E (α -tokoferolu), který slouží jako antioxidant (Miwa *et al.*, 2008).

2.4.2 Karbonylace proteinů

Karbonylace proteinů je nevratné oxidační poškození, které velmi často vede ke ztrátě funkčnosti daného proteinu. Karbonylace je nejčastěji používaný biomarker pro oxidačně poškozené proteiny a zrcadlí buněčné poškození indukované pomocí ROS. Tato modifikace může být zapříčiněna různými oxidačními dráhami. ROS mohou reagovat přímo s proteiny nebo mohou reagovat s molekulami jako jsou sacharidy nebo lipidy, které poté reagují s proteiny. Produktem této reakce jsou deriváty – aldehydy nebo ketony (Baltacioglu *et al.*, 2008). Jedním z dalších způsobů je například oxidace specifických vedlejších řetězců aminokyselin, jako je histidin, prolin či lysin, a přidání oxidovaných lipidů obsahujících karbonylovou skupinu – například malondialdehydu (Miwa *et al.*, 2008). Řada neurodegenerativních nemocí je spojována s karbonylací proteinů a jejich hromaděním v tkáních. Mezi nemoci spadající do této skupiny patří mimo jiné Alzheimerova choroba a Parkinsonova choroba (Baltacioglu *et al.*, 2008).

2.5 Včelí patogeny a paraziti a jejich vliv na zdraví včel a včelstev

Volně žijící i chované včely jsou pod nátlakem moderního světa. Jsou ovlivňovány mnoha stresory, například působení pesticidů nebo stresu z nedostatku potravy. Tyto stresory mohou poškodit imunitní odpověď, čímž se opylovatelé stávají náchylnější vůči parazitům a patogenům (Goulson *et al.*, 2015). Včelí parazité a patogeny byly rozšířeny po celém světě lidským zapříčiněním v důsledku stěhování včelstev. Rozšíření těchto onemocnění včel způsobuje významný pokles počtu včelstev (Goulson *et al.*, 2015). Opylovatelé jsou důležití pro ekosystém a pro produkci plodin. Některé patogeny jsou hostitelsky specifické pro včely (bakterie *Paenibacillus larvae*), zatímco některé mají široké spektrum hostitelů a napadají nejenom včely, ale i čmeláky. Mezi patogeny s širokým spektrem hostitelů patří například virus deformovaných křídel (DWV). Rozvoj zemědělství a s tím i častější používání pesticidů vystavuje opylovatele agrochemikáliím. Agrochemikálie mohou narušit detoxifikační systém. Dalším problémem jsou změny klimatu, které mohou v budoucnu pomoci k rozvoji těchto nemocí (Goulson *et al.*, 2015).

2.5.1 Parazitární onemocnění

2.5.1.1 Varroóza včel

Varroóza je parazitární onemocnění včelího plodu i dospělých včel. Původcem tohoto onemocnění je roztoč kleštík včelí (*Varroa destructor*). Jedinými hostiteli tohoto roztoče jsou včela medonosná (*Apis mellifera*) a včela východní (*Apis cerana*). Parazit *V. destructor* se živí hemolymfou včel a včelího plodu, berou živiny dospělým včelám a mohou přenášet některé nakažlivé nemoci včel (Veselý, 2007). Klinické příznaky se objevují až 2-3 roky po napadení parazitem. Mezi charakteristické příznaky patří nedokonale vyvinutá křídla, zadeček a zakrnělé nohy. Tyto příznaky jsou pozorovány u mladých včel a jsou typickým projevem sekundární infekce virem deformovaných křídel (DWV) (Ryabov *et al.*, 2016).

2.5.1.2 Roztočiková nákaza včel

Akarapidóza je parazitární onemocnění dospělých včel. Způsobuje ho roztočik včelí (*Acarapis woodi*). Akarapidóza nebyla v českých zemích diagnostikována více než 30 let. Příznaky onemocnění jsou viditelné až po 3-4 letech od proniknutí roztočiků do včelstva (Veselý, 2007).

2.5.2 Bakteriózy včel

2.5.2.1 Mor včelího plodu

Původcem této bakteriální nákazy je bakterie *Paenibacillus larvae*, což je gram-pozitivní bakterie tvořící velmi odolné spory. Tato bakterie napadá mladé larvy včel. U dospělých včel nepropuká tato nákaza, protože mají vyvinutou peritrofickou membránu v zažívacím traktu a větší množství enzymu fenoloxidasy nežli mají larvy. Meziprodukty reakce fenoloxidasy mají antimikrobiální účinky. V hemolymfě dospělých včel je také větší množství antimikrobiálních peptidů, například hymenoptaecinu. Larvy přijímají spory spolu s potravou (Ebeling *et al.*, 2016). Spory v zažívacím traktu klíčí a tvoří množící se bakterie, které produkují toxické látky a proteolytické enzymy. Stěny střev jsou narušeny, buňky se pohybují skrz mezibuněčný prostor a dostávají se až do hemocelu. Následně larvy umírají (Veselý, 2007). Dospělé

včely slouží pouze jako přenašeči spor, a to jak v rámci jednoho včelstva, tak i mezi ostatními včelstvy. Klinicky nemocná včelstva jsou utrácena a spálena spolu s úly a plásty, aby se zabránilo šíření nemoci (Ebeling *et al.*, 2016). Spory dokáží přežít i několik let v klidovém stádiu (Shimanuki *et al.*, 1994).

2.5.2.2 Hniloba včelího plodu

Hniloba včelího plodu je bakteriální onemocnění, které napadá nezavíčkované larvy. Je celosvětově rozšířená. Toto onemocnění způsobuje bakterie *Melissococcus pluton*, která se řadí mezi gram-pozitivní bakterie (Erban *et al.*, 2017). Mohou se vyskytovat jednotlivě nebo v řetízích. Roste v nepřítomnosti kyslíku. Bakterie jsou přijímány spolu s potravou, dostanou se do žaludku, tam se množí a vyplní celý žaludek. Infikované larvy hynou ještě před zavíčkováním. U nakažených larev se ztrácí článkování, jejich těla měknou a mění se na tmavohnědou kašovitou hmotu (tzv. příškvár). Bakterie *M. pluton* zůstávají v příškváru nejméně tři roky životaschopné (Veselý, 2007).

2.5.3 Virózy včel

Viry jsou nebuněčné organismy složené z bílkovin a nukleových kyselin. Jejich velikost se pohybuje mezi 20–300 nm (Payne, 2017). Viry se rozmnožují v buňkách určitých tkání, ty se rozpadají a zapříčiní smrt infikovaného jedince (Payne, 2017). Dosud bylo identifikováno více než 20 virových nákaz napadajících včely v různém období života. Mezi nejčastější choroby patří virus akutní paralýzy včel (ABPV), virus chronické paralýzy včel (CBPV), virus černání matečnic (BQCV), virus deformovaných křídel (DWV) a Kašmírský virus (KBV). Viry napadají jedince z různých kast. Pokud jsou kolonie stresovány, množství viru stoupá a snižuje se množství přeživších včel (Zheng *et al.*, 2015).

Nejčastějším faktorem, kdy stoupá množství stresu a tím i viru ve včelstvech (v USA a Evropě), je napadení kleštíkem včelím (*Varroa destructor*) (Zheng *et al.*, 2015). Kleštík včelí je přímým nositelem mnoha viróz, především je ale spojován s virem DWV. Množství virionů DWV ve včelách je přímo úměrné počtu kleštíků ve včelstvu. Typickými příznaky tohoto onemocnění jsou zmačkaná a scvrklá křídla (Francis *et al.*, 2013). Pokud roztoči parazitují na vyvíjejících se kuklách, dojde k vylíhnutí včel o malé

hmotnosti. Včelstva můžeme dělit na varroasenzitivní a varroatolerantní, které mohou dlouhodobě přežívat bez nutnosti léčby (Locke a Fries, 2011).

Virus černání matečniců je druhou nejrozšířenější virózou. Je spojen s nosematózou. Vede k vyhubení kolonie tím, že brání vývoji a vývinu nové včelí matky. Dochází ke žloutnutí a ztvrdnutí larev (Zheng *et al.*, 2015).

Virus pytlíčkového plodu je třetím nejčastějším virovým onemocněním včel. Vyskytuje se všude tam, kde se vyskytuje včela medonosná. Projevuje se u larev v jarních měsících, kdy dojde k částečnému rozpadu larvy. Na rozvoji se podílí pyl a nektar (Tentcheva *et al.*, 2004).

2.5.4 Houbová onemocnění

2.5.4.1 Zvápenatění včelího plodu

Zvápenatění včelího plodu je způsobeno houbou *Ascosphaera apis*, což je rozšířená parazitická houba včelích larev. Napadení touto houbou vede k velkým ztrátám včelstev. Onemocnění se projevuje převážně na jaře, kdy jsou optimální podmínky pro růst těchto hub. Larva se nakazí výtrusy nebo myceliem, které jsou většinou v potravě, někdy ale může infekce proniknout také pokožkou (Aronstein a Murray, 2010). Výtrusy v žaludku a v zadní části střeva vyklíčí a vyrostou do dlouhých vláken. Mycelium proniká stěnou střev, vyplní tělní dutinu a proroste skrz povrch larvy. Nejcitlivější jsou larvy staré 3-6 dnů (Aronstein a Murray, 2010). Onemocnění probíhá rychle a infikované larvy hynou během 2 dnů od zavičkování. Víčka infikovaných buněk jsou skvrnitá a mírně propadlá. Nemocný zavičkováný plod se mění v nažloutlou kašovitou hmotu. Později se tvoří bělavé hyfy. Spory této houby jsou odolné, infekční zůstávají po dobu 15 let. Vydrží zejména v medu, vosku a pylu (Veselý, 2007).

2.5.4.2 Nosematóza

Nosematóza je způsobena hmyzomorkou včelí (*Nosema apis*) nebo hmyzomorkou východní (*Nosema ceranae*), která má původ v Asii. Hmyzomorka včelí je houba, intracelulární parazit dospělých včel, která parazituje v gastrointestinálním traktu dospělých včel. Vyskytuje se převážně v jarních měsících. Houba tvoří spory obsahující

pólové vlákno, které je následně vystřeleno. Houba se v buňkách rozmnožuje a napadne i blízké epiteliální buňky. Po 1-2 týdnech spory dozrají, žaludeční buňky prasknou a spory se dostanou do výkalů včely. Napadené včely nejsou schopny trávit pyl, čerpají tělesné zásoby a po určité době hynou. V případě silné nákazy včely nekálejí venku jako obvykle, ale kálejí uvnitř úlu, čímž dochází k šíření nákazy (Fries, 2010). Tři až šest dní po napadení hmyzomorkou dochází k poklesu exprese čtyř antimikrobiálních peptidů – apidaecinu, abaecinu, defensinu a hymenoptaecinu – a tím i k oslabení funkce imunitního systému včel (Chaimanee *et al.*, 2012).

2.5.5 Vliv prostředí

Organismy jsou vystavovány působení chemikálií a xenobiotik. Mezi xenobiotika patří například léčiva, pesticidy a hnojiva. Tyto látky se u savců vstřebávají kůží, trávicím traktem a plícemi. Během toho, co včely sbírají pyl, vodu a další látky potřebné pro život v úlu, přijdou do styku s toxickými látkami, které se do jejich těla dostávají převážně trávicím traktem. Pyl obsahuje mimo jiné i fenolické látky, které mohou být nejenom toxické, ale i biologicky aktivní (Goulson *et al.*, 2015).

Jedním z typů pesticidů jsou organofosfáty, které ovlivňují fagocytózu. Fagocytóza bývá doprovázena produkcí melaninu, to vede k tvorbě ROS. Kyslíkové radikály mohou eliminovat patogeny (James a Xu, 2012). Neonikotinoidy jsou jednou ze tříd insekticidů. Jde o neurotoxiny, které působí na nervový systém a následně způsobí paralýzu a smrt (Goulson *et al.*, 2015). Neonikotinoidy jsou používány k ochraně rostlin před mšicemi a jiným hmyzem.

2.6 Metody stanovení celkových kyslíkatých radikálů a metody měření lipidické peroxidace

Superoxiddismutasa je jedním z nejdůležitějších antioxidačních enzymů. Tento enzym je schopen dismutovat superoxydy, čehož je využíváno pro stanovení aktivity tohoto enzymu (Matouskova *et al.*, 2014). Metody stanovení aktivity SOD jsou založeny na jeho schopnosti inhibovat reakci superoxidů s různými činidly. Tím se řadí mezi nepřímé metody. Jednoduchá metoda pro stanovení aktivity superoxiddismutasy je popsána v protokolu dle Marklunda a Marklundové (1974). Tato metoda je založená na schopnosti enzymu inhibovat autooxidaci pyrogallolu. Vzorek obsahující SOD,

reagující s 10 µl pyrrogallolu rozpuštěném v HCl, již po několika minutách mění své zbarvení z bezbarvého na žlutý roztok. Spektrofotometricky je při vlnové délce 420 nm měřen nárůst absorbance během 5 minut (Marklund a Marklund, 1974).

Katalasa je neméně důležitý antioxidantní enzym, který zajišťuje rozklad peroxidu vodíku na vodu a kyslík (Mates et al., 1999). Aktivita katalasy je měřena pomocí spektrofotometrické metody podle Aebi (1984). U tohoto stanovení je pozorován pokles absorbance při rozkladu peroxidu vodíku, měřené při 240 nm. Peroxid vodíku je rozkládán enzymem obsaženým v homogenátu včel a tím klesá absorbance (Aebi, 1984). Změna absorbance je poté použita ve výpočtu specifické aktivity, ke které je potřeba znát celkový obsah proteinů v homogenátu tělních částí včel. Množství proteinů je měřeno podle protokolu Bradforda (1976), upraveného linearizací podle Ernsta (2010). Při této linearizaci se absorbance měří při dvou vlnových délkách, a to při 590 nm a 450 nm (Bradford, 1976, Ernst a Zor, 2010). Změřené absorbance jsou poté dány do poměru a pomocí kalibrační křivky je dopočítáno množství proteinů v tělních částech včel.

Lipidická peroxidace je děj, kdy jsou pomocí ROS napadány polynenasycené mastné kyseliny, které jsou součástí buněčných membrán (Heath a Packer, 1968). Jednou z metod stanovení lipidické peroxidace je metoda TBARS. Je to postup založený na stanovení sekundárních koncových produktů, v tomto případě pro měření množství malondialdehydu (MDA). Tato látka vzniká v organismu během autooxidace či enzymové degradace mastných kyselin (Hodges *et al.*, 1999). Stanovení MDA je založeno na reakci malondialdehydu s dvěma molekulami kyseliny thiobarbiturové pomocí kyseliny katalyzované nukleofilní adice. Při této reakci vzniká růžové zbarvení s absorpčním maximem při vlnové délce 532 nm. Následně je spektrofotometricky měřena absorbance zbarveného roztoku (Djovkar a Kappus, 1985). Tato metoda je často kritizována za nedostatečnou specifickou. Množství MDA může být nadhodnoceno vlivem interferujících látek, jako jsou například sacharidy či flavonoidy (např. anthokyaniny) (Hodges *et al.*, 1999).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Biologický materiál

V rámci experimentální části bylo pracováno se vzorky včely medonosné (*Apis mellifera*). Včely byly odebrány ze tří experimentálních včelstev ze stanoviště na Kývalce. Odebrány byly v průběhu roku 2016, v měsících červen, červenec, srpen a září. Vzorky byly zamrazeny a uchovávány při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tyto včely sloužily ke sledování vývoje různých biochemických parametrů během roku.

Pro porovnání bylo pracováno se skupinou imunizovaných včel. Tyto experimentální včely byly ve stáří 10 dní odebrány z pokusných včelstev na stanovišti na Kývalce. Tyto desetidenní včely žily od vylíhnutí až po jejich odběr ve včelstvech za běžných podmínek, kde vykonávaly své funkce. Následně byly značené desetidenní včely převezeny do laboratoře, kde byly rozděleny do pokusných skupin: 1) skupina pouze narkotizovaná pomocí CO_2 ; 2) skupina narkotizovaná CO_2 a stimulovaná vpichem $5\ \mu\text{l}$ sterilního $0,1\text{M}$ PBS (pH 7); 3) skupina narkotizovaná CO_2 a stimulovaná vpichem $5\ \mu\text{l}$ $0,1\text{M}$ PBS (pH 7) obsahujícím 1×10^6 směsi bakterií *Paenibacillus larvae* a *Escherichia coli*. Jednotlivé pokusné skupiny včel byly po dobu 24 hodin drženy v inkubátoru při teplotě $35\text{ }^{\circ}\text{C}$. Následně byly včely usmrceny mrazem a uloženy v mrazáku nastaveném na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.1.2 Chemikálie

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

Butyl-hydroxytoluen (Sigma-Aldrich, Německo)

Coomasie Brilliant Blue G-250 (Bio-Rad, USA)

Hovězí sérový albumin (Sigma-Aldrich, USA)

Kyselina ethylendiamintetraoctová (Sigma-Aldrich, Německo)

Kyselina fosforečná 85% (Sigma-Aldrich, Německo)

Kyselina trichloroctová (Lach-Ner, Česká republika)

Kyselina thiobarbiturová (Sigma-Aldrich, Německo)

Metanol (Lach-Ner, Česká republika)

Peroxid vodíku 30% (Penta, Česká republika)

Pyrogallol (Sigma-Aldrich, Německo)

Superoxiddismutasa z hovězích erythrocytů (Serva, Německo)

Tris (Sigma-Aldrich, Německo)

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)

Chlazená centrifuga 5418 R (Eppendorf, Německo)

Kulový mlýnek FastPrep FP120 (Thermo Savant, USA)

Mikrodestičkový spektrofotometr Reader Synergy H1 (BioTek Instruments, USA)

Termoblok CH-100 (Biosan, Litva)

Termostatovaná třepačka PST-100HL (Biosan, Litva)

Vortex V1-Plus (Biosan, Litva)

3.2 Metody

3.2.1 Spektrofotometrické stanovení koncentrace proteinů

Koncentrace proteinů ve vzorcích byla stanovována metodou dle Bradforda (1976). Stanovení je založeno na vazbě barviva Coomassie Brilliant Blue G-250 na protein. Do jamek na mikrodestičce bylo nanášeno 5 μl standardu (hovězí sérový albumin, BSA; $c = 50\text{--}500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), resp. vzorku proteinu (jednotlivé tělní části včel dvacetkrát naředěné 0,1M K-Pi pufrém, (pH 7)), 45 μl deionizované vody a 200 μl pracovního roztoku Bradfordova činidla. Pracovní roztok tohoto činidla byl připraven naředěním zásobního roztoku Bradfordova činidla. Příprava zásobního roztoku spočívá v rozpuštění 50 mg Coomassie Brilliant Blue G250 v 25 ml methanolu a 50 ml 85% kyseliny fosforečné. Vše bylo doplněno deionizovanou vodou na objem 100 ml. Pracovní roztok byl vždy připraven čerstvý před vlastním měřením, kdy byl zásobní roztok naředěn deionizovanou vodou v poměru 1:4. Po napipetování reakčních komponent do jamek bylo mikrodestičkou protřepáno. Po 5 minutách vyvíjení zbarvení

bylo provedeno samotné měření. Spektrofotometrické měření proběhlo při vlnových délkách 450 nm a 590 nm (Ernst a Zor, 2010).

3.2.2 Spektrofotometrické stanovení aktivity katalasy

Pro měření aktivity enzymu katalasy (CAT) byly využity jednotlivé tělní části (hlava, hrud', zadeček) včel, pocházejících ze včelstev 23, 24 a 131. Tyto včely byly odebrány v období června až září. U imunizované skupiny vzorků bylo pracováno pouze se zadečky včel. Vzorky hlav byly použity koncentrované, hrudní části byly pro měření 2× zředěny 0,1M K-Pi pufrům a zadečky byly naředěny 5×. Z naměřených hodnot a z koncentrace proteinů změřených metodou dle Bradforda (1976) byla stanovena specifická aktivita CAT.

3.2.2.1 Příprava vzorků včel pro měření aktivity katalasy

Vzorky včel byly uchovávány v mrazáku při -80 °C. Po oddělení hlavy byl z tělní části odstraněn trávicí trakt a následně bylo tělo rozděleno na hrud' a zadeček a jednotlivé části byly vloženy do mikrozkušavek. Ke každé části bylo přidáno cca 10 ks homogenizačních skleněných kuliček a 100 µl 0,1M K-Pi pufru, (pH 7). Vzorky byly homogenizovány v kulovém mlýnku a poté bylo přidáno dalších 100 µl 0,1M K-Pi pufru (pH 7) a obsah mikrozkušavek byl opět homogenizován. Následovala centrifugace při 12000 ×g, při teplotě 5 °C po dobu 10 minut. Vzorky byly drženy na ledové lázni, popřípadě byly skladovány v mrazáku při -30 °C.

3.2.2.2 Měření aktivity katalasy

Měření bylo provedeno dle protokolu podle Aebi (1984) s optimalizovanými parametry. Pro zjištění aktivity CAT byl spektrofotometricky měřen pokles absorbance při vlnové délce 240 nm, který odpovídá poklesu koncentrace peroxidu vodíku.

Do jamek mikrodestičky kompatibilní s měřením v UV oblasti bylo napipetováno 10 µl ředěného vzorku a 220 µl 0,1M K-Pi pufru (pH 7). Na readru Synergy H1 byl měřen pokles absorbance 150 mM peroxidu vodíku během jedné minuty. Peroxid vodíku byl do mikrodestičky přidáván přístrojem, objem přidávaného peroxidu byl 20 µl. Každý vzorek byl měřen v triplicátech po dobu 60 sekund při teplotě 30 °C. Po

změření počáteční a konečné absorbance byla proměřena optická dráha každé z jamek. Poté byla spočítána aktivita vztažená na jednotku času.

Před každou sérií měření byl nově naředěn 150 mM peroxid vodíku. Kvůli nestabilitě této látky byla před každým ředěním stanovena koncentrace 30% peroxidu vodíku. Pro toto stanovení byl peroxid 500× zředěn a poté byla pomocí spektrofotometru změřena absorbance roztoku při vlnové délce 240 nm. Změřená absorbance, dělená extinkčním koeficientem ($43,6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) a vynásobená 500×, udává koncentraci 30% peroxidu vodíku.

Změna absorbance byla měřena po dobu 60 sekund, namísto 120 sekund. Po změření kinetiky, byla také změřena absorbance při 900 a 977 nm. Rozdíl těchto absorbancí udával délku optické dráhy potřebnou pro následný výpočet (viz. příloha I).

3.2.3 Spektrofotometrické stanovení aktivity superoxididismutasy

Pro měření aktivity enzymu superoxididismutasy (SOD) byly využity hrudníky a zadečky imunizovaných včel. Hlavy včel nebyly použity, jelikož v nich nebyla detekována aktivita SOD. Homogenáty z hrudí a zadeček byly pro měření aktivity SOD 50× zředěny Tris-EDTA pufrům (pH 8,2; $c = 23,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris; $c = 3,8 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA). Z naměřených hodnot a z koncentrace proteinů změřených metodou dle Bradforda (1976) byla stanovena specifická aktivita udávaná v jednotkách. Jednotka aktivity superoxididismutasy je definována jako množství enzymu katalyzující 50% inhibici rychlosti oxidace pyrogallolu. Specifická aktivita SOD je poté vztažena na množství proteinů ve vzorku (viz. příloha II). Aktivita enzymu je poté udávána jako jednotka na miligram celkových proteinů [$\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$].

3.2.3.1 Příprava vzorků pro stanovení aktivity superoxididismutasy

Vzorky včel byly rozděleny na hlavu, hrud' a zadeček, přičemž z tělní části byl nejdříve vyjmut trávicí trakt. Jednotlivé hrudníky a zadečky byly vloženy do mikrozkuavek. Každá část byla homogenizována v 200 μl vychlazeného Tris-EDTA pufru (pH 8,2). Vzorky byly homogenizovány v kulovém mlýnku a poté následovala centrifugace při 16000 $\times g$, při teplotě 4 °C a po dobu 10 minut. Po centrifugaci byl supernatant odebrán a patřičně naředěn. Vzorky byly po celou dobu uchovávány na ledové lázni.

3.2.3.2 Spektrofotometrické stanovení aktivity superoxiddismutasy

Principem spektrofotometrického stanovení aktivity SOD dle Marklunda a Marklundové (1974) je nárůst absorpance roztoku při měření za vlnové délky 420 nm. Je sledována změna absorpance během 5 minut při 25 °C. Nárůst absorpance odpovídá autooxidaci přidávaného kyselého roztoku pyrogallolu.

Vlastnímu měření předcházela optimalizace metody s využitím enzymu superoxiddismutasy z hovězích erythrocytů (EC 1.15.1.1). Enzym byl naředěn na koncentraci 0,1–1000 $\mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$. Měření probíhalo v 96 jamkových destičkách a každý standard (či vzorek) byl měřen v triplicátech. Do kontrolních jamek bylo pipetováno 240 μl Tris-EDTA pufru (pH 8,2) a přímo přístrojem bylo přidáváno 20 μl 2 mM pyrogallolu v 10 mM HCl. Do dalších jamek bylo pipetováno 20 μl standardu (či extraktu jednotlivých tělních částí včel), 220 μl Tris-EDTA pufru (pH 8,2) a opět 20 μl roztoku pyrogallolu. Roztok pyrogallolu byl vždy před samotným měřením nově připraven.

3.2.4 Stanovení lipidické peroxidace

Stanovení lipidické peroxidace je založeno na stanovení koncentrace malondialdehydu ve vzorcích včel. Byla využita metoda TBARS, která využívá kyseliny thiobarbiturové (TBA). Pro měření lipidické peroxidace byly využity imunizované vzorky včel. Tyto včely byly odebrány v roce 2017 a v tomto případě bylo pracováno s celými včelami, kterým byl vyjmut trávicí trakt. Měření bylo provedeno v mikrodestičkovém uspořádání na readru Synergy H1 při vlnové délce 532 nm. Kvůli interferenci některých látek, jsou absorpance odečteny z roztoku obsahujícího extrakt inkubovaný s roztokem bez přísady TBA (čínidlo A), od identického vzorku, který obsahoval roztok s TBA (čínidlo B) (Hodges *et al.*, 1999). Rozdíly naměřených absorpací byly poté pomocí kalibrační rovnice převedeny na koncentraci malondialdehydu. Koncentrace byla uváděna v jednotkách [$\text{nmol}\cdot\text{ml}^{-1}$].

3.2.4.1 Stanovení kalibrační rovnice pro měření lipidické peroxidace

Při sestavení kalibrační rovnice bylo pracováno s 1,1,3,3-tetraethoxypropanem. Kalibrační přímka měla rozsah 0,25–10 $\text{nmol}\cdot\text{ml}^{-1}$ a kalibrační řada byla proměřena v mikrodestičkách. Do jamek bylo pipetováno 100 μl standardu o koncentraci

0,5-20 nmol·ml⁻¹. K tomu bylo přidáno 100 µl činidla. Každá koncentrace byla inkubována jak s činidlem A, tak i s činidlem B, a vše bylo měřeno v technických triplikátech. Činidlo A obsahovalo 20% kyselinu trichloroctovou a 0,01% butyl-hydroxytoluenu. Činidlo B mělo stejné složení, jako činidlo A, ale navíc obsahovalo 0,65% kyseliny thiobarbiturové. Inkubace probíhala na termostátované třepačce po dobu 1 hodiny a při 60 °C. Při inkubaci byla mikrodestička uzavřena víčkem, avšak při následném chlazení na ledové lázni bylo víčko odstraněno. Poté byla změřena absorbance při vlnové délce 532 nm. Z těchto naměřených hodnot a koncentrací standardů byla sestavena kalibrační přímka s kalibrační rovnicí.

3.2.4.2 Příprava vzorků pro měření lipidické peroxidace

Vzorky včel byly homogenizovány v třecí misce s tlučkem, kdy byla včela zmrazena tekutým dusíkem a poté pomocí tlučku rozdrčena na prášek. Poté bylo přidáno 750 µl 80% ethanolu. Celá směs byla přepipetována do mikrozkušavek a následovala centrifugace při 15000 ×g, při teplotě 5 °C a po dobu 10 minut. Po dokončení centrifugace byl supernatant odebrán a dvakrát naředěn. Vzorky byly uchovávány na ledové lázni.

3.2.4.3 Obohacení vzorku o standard TEP, a jeho zpětné stanovení ve vzorku

Osm vzorků, připravených dříve popsáním způsobem, bylo napipetováno do jamek. Do jamek bylo pipetováno 50 µl vzorku, 50 µl 80% ethanolu a poté bylo přidáno 100 µl činidla A nebo B. Poté proběhla inkubace, ochlazení a proměření při vlnové délce 532 nm. Následně byl připraven standard TEP o koncentraci 6 nmol·ml⁻¹. Do druhé mikrodestičky bylo do každé z jamek napipetováno 50 µl vzorku, 45 µl 80% ethanolu a 5 µl standardu TEP. Poté bylo přidáno 100 µl činidla A nebo B. Následně proběhla 60 min inkubace na termostátované třepačce a ochlazení na ledové lázni. Po ochlazení byla změřena absorbance takto upraveného vzorku a byla vypočítána koncentrace. Rozdílem obou koncentrací byl zpětně stanoven přidávaný standard TEP.

3.2.4.4 Spektrofotometrické stanovení lipidické peroxidace

Vzorky imunizovaných včel byly připraveny výše popsáním postupem. Stanovení probíhalo dle protokolu Hodgese (1998) a bylo založeno na principu

spektrofotometrického stanovení absorbance při vlnové délce 532 nm. Měření probíhalo v 96 jamkových destičkách a každý vzorek byl měřen v triplicátech. Do kontrolních jamek bylo pipetováno 100 μ l vody a 100 μ l činidla A nebo B. Do dalších jamek bylo pipetováno 50 μ l extraktu jednotlivých včel, dále pak 50 μ l 80% EtOH a vše bylo doplněno na objem 200 μ l jedním z činidel. Po napipetování byla mikrodestička přikryta víčkem a zajištěna parafilmem. Po hodinové inkubaci při 60 °C byla otevřená mikrodestička ponechána na ledové lázni a následovalo změření absorbance na readru Synergy H1.

3.3 Statistické vyhodnocení

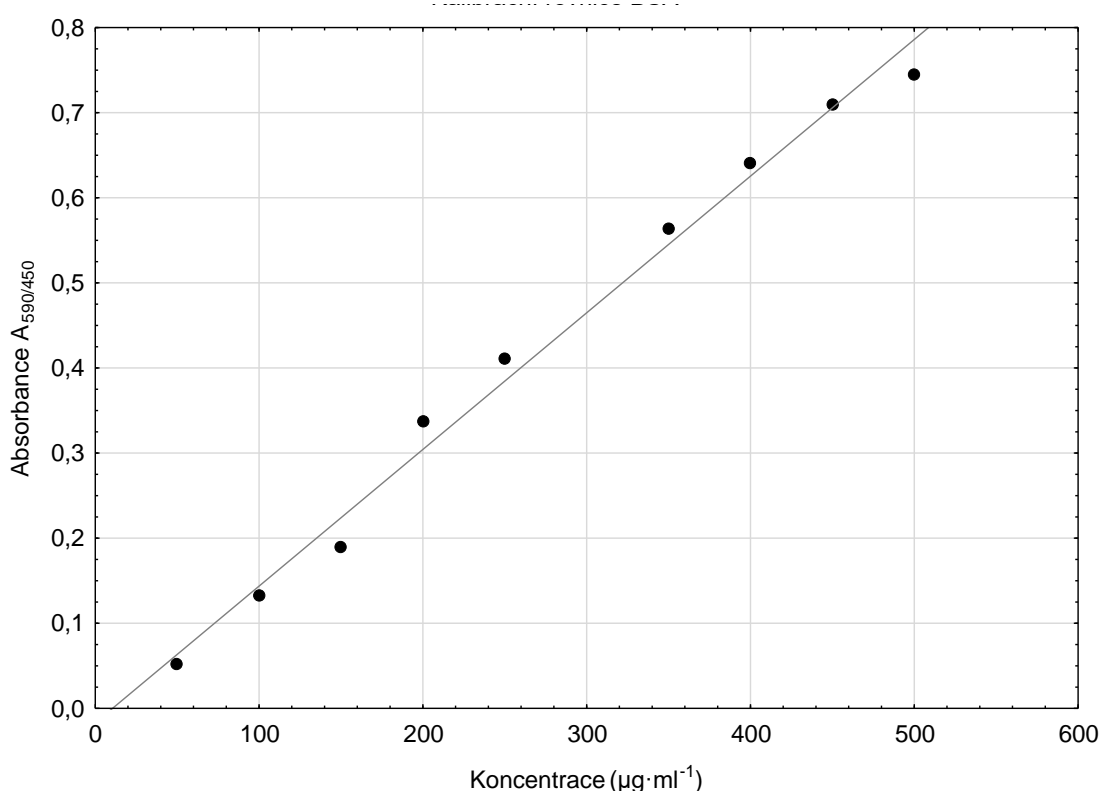
Pro základní kalkulace dat pocházejících z popisovaných experimentů byl použit program Microsoft Excel 2010. Pro znázornění výsledků byly použity krabicové, tzv. box-plot grafy, vytvořené v programu Statistica 13.4.0. Získaná data byla statisticky vyhodnocena v tomtéž programu, a pomocí metody ANOVA s post-hoc Bonferroniho testem. Statistická významnost použitých t-testů byla hodnocena na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. U měření lipidické peroxidace byl také použit t-test pro střední hodnotu.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Kalibrace pro výpočet koncentrace proteinů

Pro výpočet koncentrace proteinů ve vzorcích byla nejprve vypočítána kalibrační rovnice. Pro její stanovení byl sestrojen graf z hodnot absorbancí (Obr. 12). Tyto absorbance byly naměřeny ve standardu hovězího sérového albuminu o koncentracích 50–500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Koncentrace proteinů ve vzorcích včel byly počítány z rovnice přímky ($y = 0,0016x - 0,0168$), s koeficientem determinace $R^2 = 0,9896$. Koncentrace proteinů byla stanovena spektrofotometricky metodou dle Bradforda (1976) a upravené linearizací dle Ernsta (2010). Tato úprava spočívala v měření absorbance roztoku při vlnových délkách 450 a 590 nm. Tato úprava slouží k linearizaci kalibrační přímky v koncentracích, kde u původního měření dochází k zakřivení.

Optimalizace této metody spočívala ve správném naředění vzorku. Všechny extrakty byly 20× ředěny 0,1M K-Pi pufrům.



Obrázek 12 Kalibrační křivka standardu BSA pro přepočet koncentrací proteinů ve vzorcích, s koncentračním rozmezím 50–500 $\mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$. Rovnice křivky pro přepočet koncentrace je $y = 0,0016x - 0,0168$; $R^2 = 0,9896$.

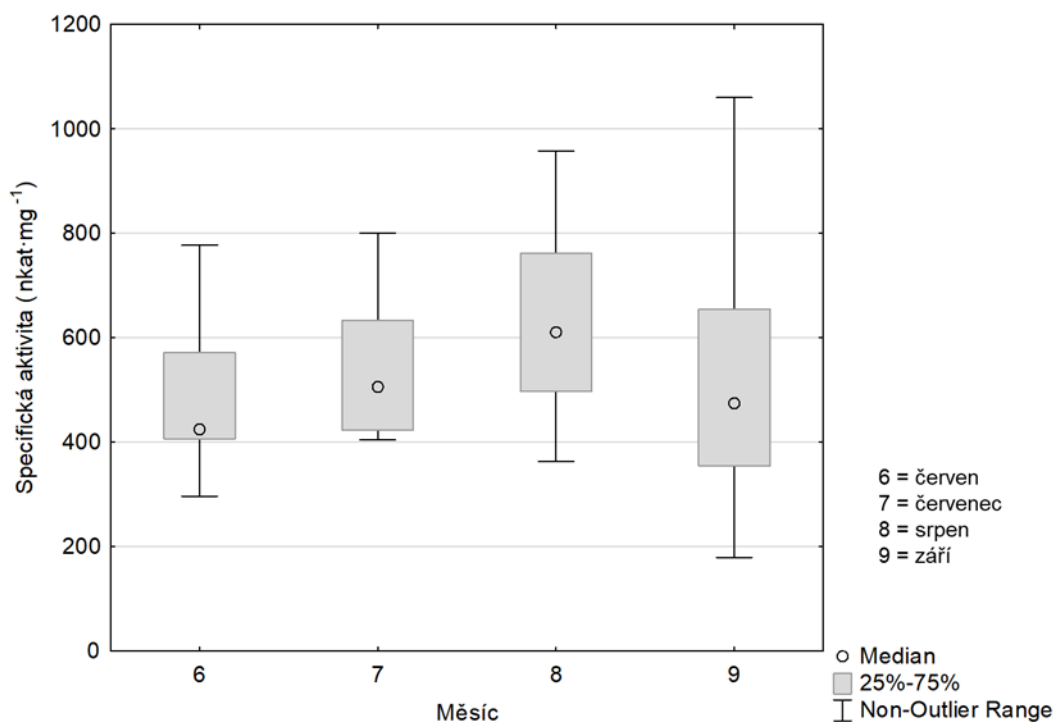
4.2 Stanovení specifické aktivity enzymu katalasy

Specifická aktivita je veličina, získaná z aktivity v nanokatalách [nkat] vztažené na 1 miligram [mg] proteinu. Jednotkou je tedy $\text{nkat}\cdot\text{mg}^{-1}$. Tato veličina vyjadřuje přítomnost (množství) enzymu ve zhomogenizovaných tkáních, v nichž byly také změřeny koncentrace proteinů. Měření probíhalo dle původního protokolu podle Aebi (1984). Některé parametry, jako je koncentrace peroxidu vodíku a čas pro měření změny absorbance, byly optimalizovány. Nejdříve bylo pracováno s čistým komerčním enzymem, následně s připravenými extrakty včel.

Mezi optimalizované parametry patří množství přidávaného extraktu. Extrakty z hlav byly používány koncentrované, zatímco extrakty z hrudníků byly 2× ředěny. Zadečky včel byly ředěny 5×. Pro ředění byl používán 0,1M K-Pi pufr (pH 7).

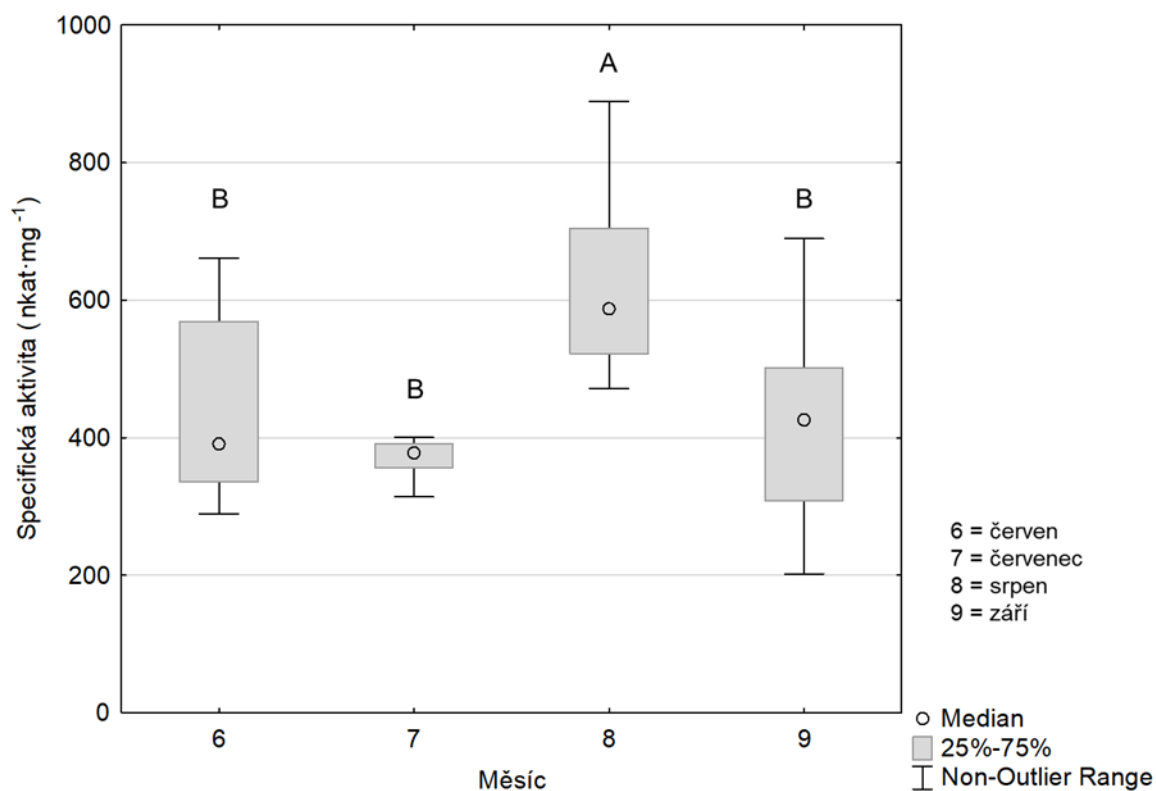
4.2.1 Profil aktivity katalasy na včelách odebraných v různých měsících roku

Byl vytvořen profil specifické aktivity katalasy v rámci měsíců. Profil byl měřen pro každou tělní část zvlášť. V hlavách včel je obsaženo nejmenší množství enzymu, tudíž i aktivita je zde nejnižší. Specifická aktivita katalasy se zde pohybuje v rozmezí 300–1000 $\text{nkat}\cdot\text{mg}^{-1}$ (Obr. 13). Hodnoty jsou rozdílné v rámci měsíců, kdy v měsících červen a červenec se naměřené hodnoty nacházely v rozmezí 400–700 $\text{nkat}\cdot\text{mg}^{-1}$. V měsíci srpnu můžeme vidět nárůst specifické aktivity, kdy se hodnoty pohybují od 500 do 900 $\text{nkat}\cdot\text{mg}^{-1}$. V měsíci září nastal pokles, kdy se specifická aktivita katalasy pohybovala v rozmezí 300–700 $\text{nkat}\cdot\text{mg}^{-1}$. Statistické vyhodnocení ukázalo, že tyto skupiny nejsou vzájemně signifikantně odlišné.



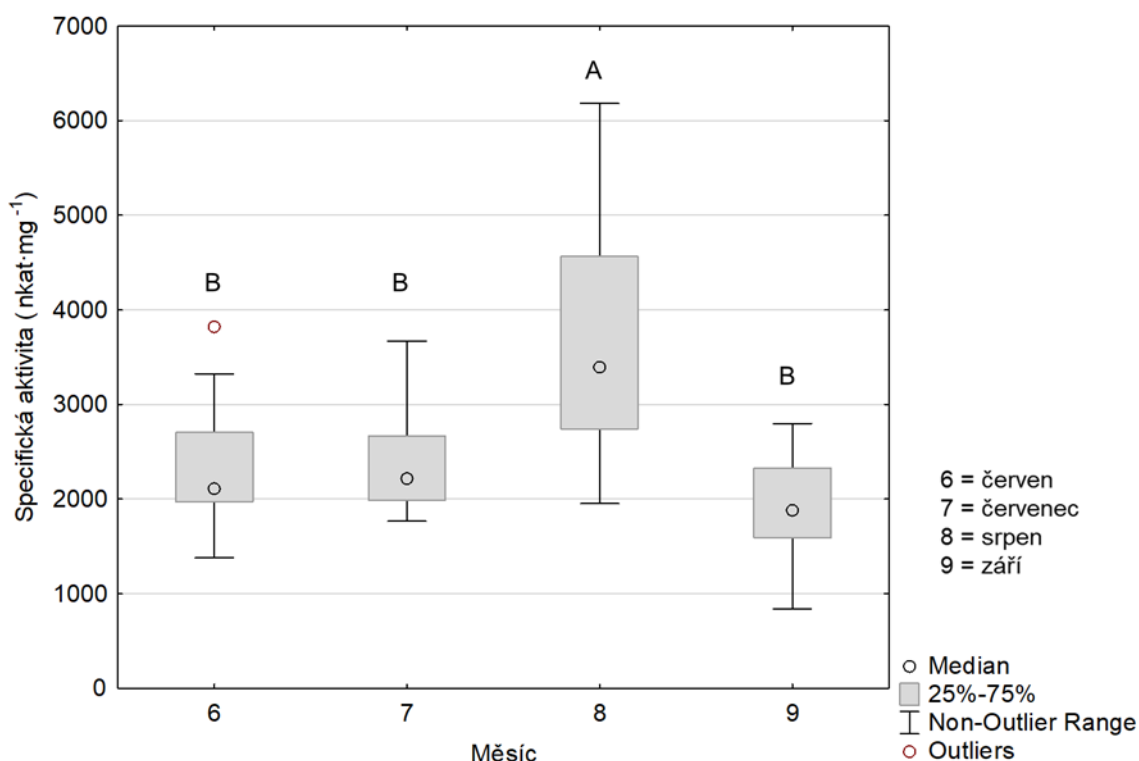
Obrázek 13 Specifická aktivita katalasy v hlavách experimentálních včel v rámci měsíců červen až září, n = 15

V hrudnicích včel se nachází velké množství létacích svalů, které vykazují vysokou metabolickou aktivitu včel. Dýchací řetězec je jeden z hlavních zdrojů ROS v organismu (Suarez et al., 1999). Aktivita katalasy je v této tělní části vyšší než u hlav, ovšem vzhledem k velkému množství proteinů je specifická aktivita nižší. V měsíci červnu se specifická aktivita pohybovala ve velkém rozmezí 300–600 nkat·mg⁻¹, zatímco v měsíci červenci je rozmezí velmi úzké. Hodnoty se zde pohybovaly od 350 do 450 nkat·mg⁻¹. U hrudníků se projevuje stejný trend jako u hlav, kdy specifická aktivita v měsíci srpnu je vyšší, nežli je u zbylých měsíců. V srpnu se naměřené hodnoty pohybovaly od 500 do 800 nkat·mg⁻¹. V září je vidět znatelný pokles, kdy hodnoty dosahovaly menších hodnot, a to od 300 do 500 nkat·mg⁻¹ (Obr. 14). Bylo zjištěno, že hodnoty v měsíci srpnu jsou od zbylých měsíců signifikantně odlišné.



Obrázek 14 Specifická aktivita katalasy v hrudnicích experimentálních včel v rámci měsíců červen až září, n= 15

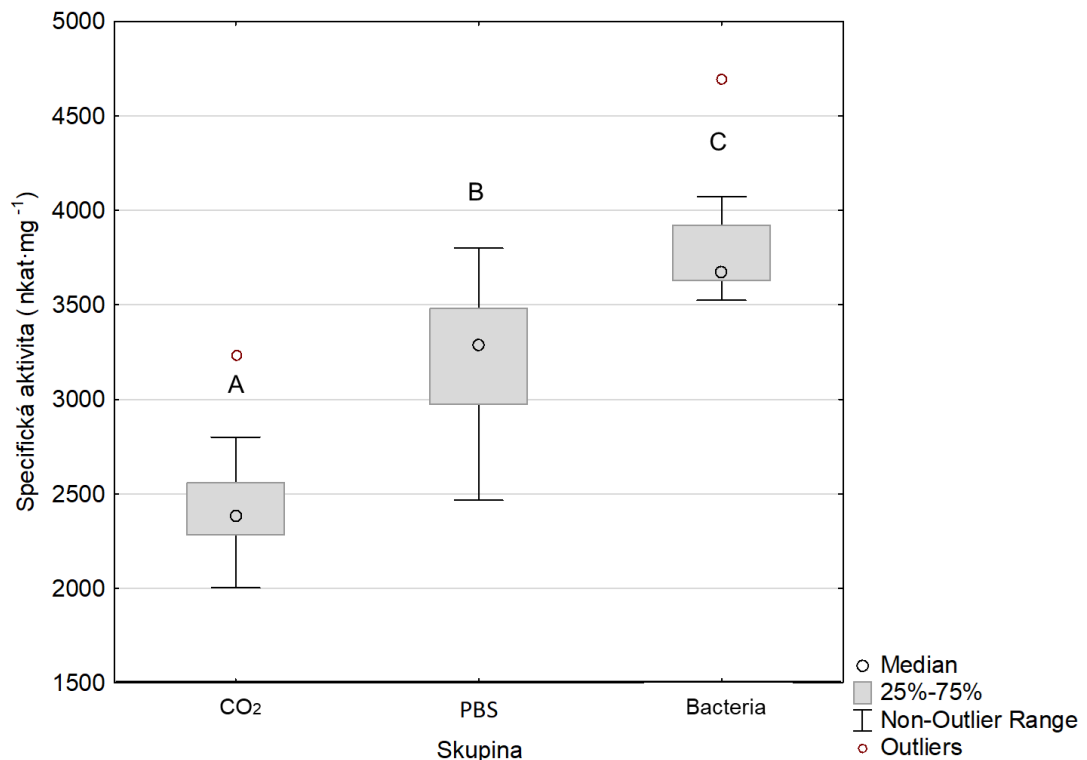
U zadečků je vidět podobný trend jako u předchozích tělních částí. Ovšem hodnoty specifické aktivity jsou zde vyšší. V grafu (Obr. 15) můžeme vidět, že v měsících červnu a červenci byly hodnoty specifické aktivity katalasy v rozmezí od 1800 do 3800 nkat·mg⁻¹. V měsíci srpnu byly hodnoty v širokém rozmezí, a to 2500–4500 nkat·mg⁻¹. V měsíci září dosahovaly naměřené výsledky nižších hodnot. Tyto výsledky se nacházely v rozmezí 1600–2800 nkat·mg⁻¹. Výsledky za měsíc srpen byly signifikantně odlišné od výsledků z měsíců červen, červenec i srpen.



Obrázek 15 Specifická aktivita katalasy v zadečcích experimentálních včel v rámci měsíců června až září, kdy n= 15

4.2.2 Stanovení aktivity katalasy po *in vitro* imunizaci včel

U imunizovaných včel bylo pracováno pouze se zadečky. V nich byla opět změřena koncentrace proteinů, a tyto hodnoty byly později použity pro výpočet specifické aktivity katalasy. V grafu (Obr. 16) můžeme vidět, že kontrolní skupina, která obsahovala včely pouze uspané pomocí oxidu uhličitého, vykazovala nejmenší specifickou aktivitu katalasy. Hodnoty dosahovaly hodnot od 2200 do 2800 nkat·mg⁻¹. Vyšší specifická aktivita byla nejspíše zapříčiněna stresem, který včele vznikl při narkóze. U druhé skupiny včel uspaných pomocí CO₂ a poté stimulovaných vpichem sterilního PBS roztoku, můžeme vidět vyšší hodnoty specifické aktivity než u kontrolní skupiny. Naměřené výsledky se pohybovaly v rozmezí 2800–3800 nkat·mg⁻¹. Aktivita katalasy zde byla zvýšená, nejspíše jako reakce na stres způsobený vpichem jehly. Skupina včel narkotizovaných pomocí CO₂ a poté stimulovaná vpichem PBS roztoku obsahujícího suspenzi bakterií vykazovala signifikantně nejvyšší hladiny specifické aktivity katalasy (3600–4600 nkat·mg⁻¹).



Obrázek 16 Specifická aktivita katalasy v zadečcích imunizovaných včel, kdy n = 10

Nejvyšší specifická aktivita katalasy byla stanovena v zadečcích včel. Weirich (2002) zjistil, že nejvyšší aktivita CAT je ve spermatu a žaludcích včel. Žaludek, spolu se zbytkem trávicího traktu, se nachází v zadečcích včel (Weirich et al., 2002). U sledovaných vzorků byl trávicí trakt odstraněn, aby nedošlo k ovlivnění výsledků. Za hlavní místo výskytu enzymu katalasy jsou považovány peroxisomy, tudíž velké množství tohoto enzymu mohlo být ztraceno centrifugací a následným odběrem samotného supernatantu (Weirich et al., 2002). U imunizovaných včel se potvrdil předpoklad, že se vzrůstajícím stresem roste i aktivita antioxidantních enzymů. Huang (2012) ve své studii mimo jiné prokázal, že napadení patogenem snižuje rezistenci vůči stresu (Huang, 2012).

4.3 Stanovení specifické aktivity enzymu superoxiddismutasy

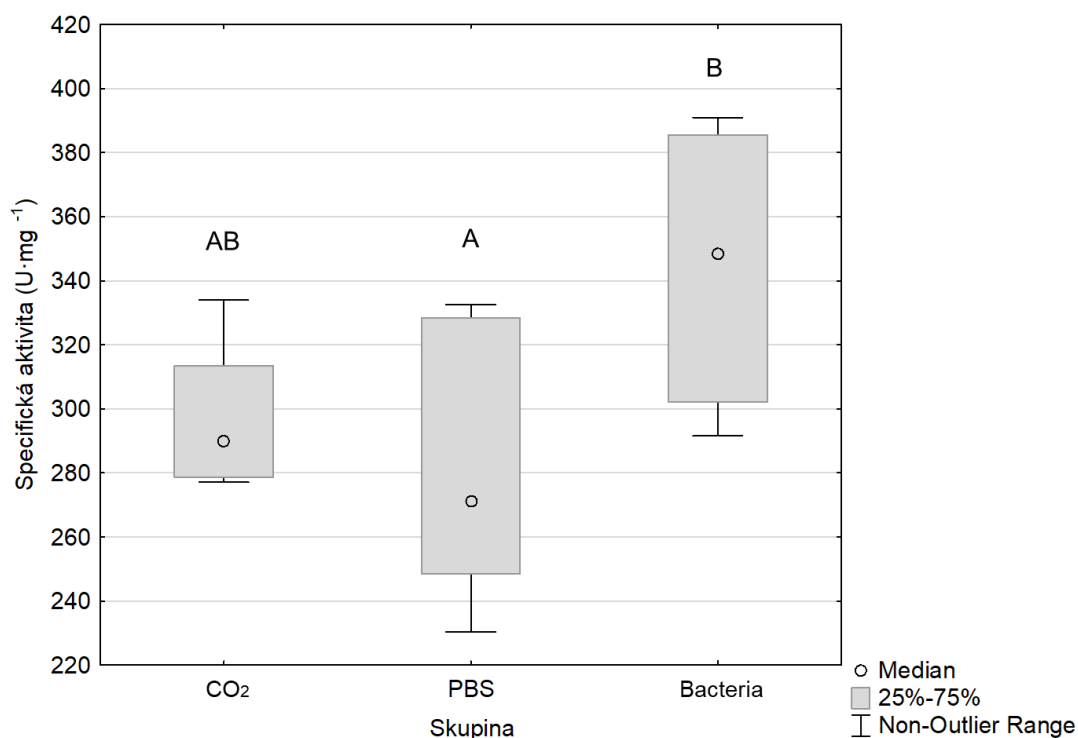
Specifická aktivita superoxiddismutasy byla získána vztažením naměřené aktivity na množství proteinů ve vzorku. Aktivita enzymu SOD se udává v jednotkách [U]. Jednotka udává množství enzymu katalyzující 50% inhibici rychlosti oxidace pyrogallolu. Množství proteinů je udáváno v miligramech [mg], celková jednotka specifické aktivity SOD je tedy jednotka na miligram [U·mg⁻¹]. Tato metoda byla

založena na původním protokolu od Marklunda a Marklundové (1974), ovšem některé z parametrů byly optimalizovány.

Optimalizace parametrů byla nejdříve provedena s čistým enzymem superoxiddismutasou z hovězích erythrocytů v koncentraci $1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Měření bylo provedeno s roztoky $1\times$ až $100\,000\times$ naředěného enzymu. Inhibice pyrogallolu při tisícinásobném ředění dosahovala cca 40 %. U vyšších koncentrací nebyl v reakční směsi zaznamenán dostatečný nárůst absorbance, což odpovídalo minimální autooxidaci pyrogallolu. Respektive, autooxidace byla vlivem vysoké aktivity SOD z velké části inhibována. Následně byly optimalizované parametry testovány na vzorcích experimentálních včel. Byl hledán optimální objem extrakčního činidla, odpovídající ředění a množství pipetovaného vzorku. Pro extrakci bylo používáno 200 μl Tris-EDTA pufru (pH 8,2) a homogenát byl následně $50\times$ ředěn. Objem vzorku použitého pro reakci byl 20 μl .

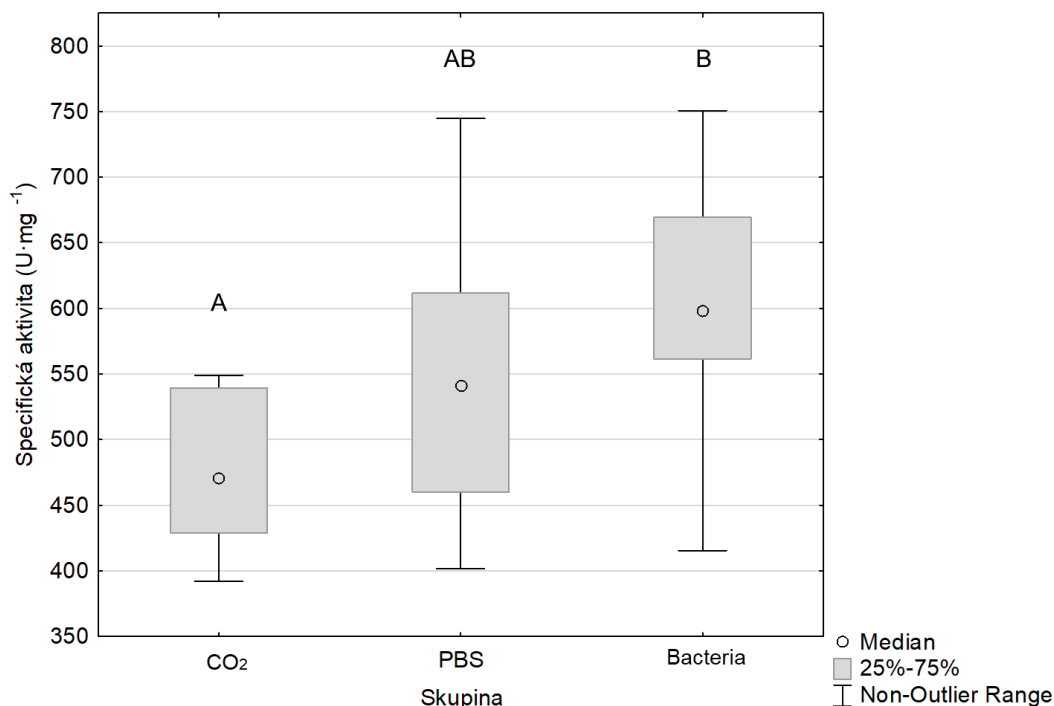
Po optimalizaci následovalo samotné měření s extrakty imunizovaných včel. Konkrétně byly použity hrudníky a zadečky včel. Opět bylo pracováno se třemi skupinami imunizovaných včel.

Obr. 17 zobrazuje graf s výsledky měření specifické aktivity SOD. U kontrolní skupiny se specifická aktivita superoxiddismutasy pohybovala od 260 do $320 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$. U skupiny stimulované injekcí s PBS roztokem je vidět širší rozsah hodnot, od 210 do $380 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$. U skupiny včel stimulovaných suspenzí bakterií je vidět také široký rozsah hodnot, a to $260\text{--}390 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$. Signifikantně odlišnou aktivitu SOD měly pouze včely ze skupiny stimulované PBS se suspenzí bakterií.



Obrázek 17 Specifická aktivita superoxidodismutasy v hrudnicích imunizovaných včel, kdy $n = 10$

U kontrolní skupiny, kde včely byly pouze narkotizovány, můžeme vidět hodnoty specifické aktivity v rozmezí $400\text{--}550\text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ (Obr. 18). Tato skupina byla opět považována za kontrolní skupinu. U skupiny, kde byly včely stimulovány vpichem sterilního PBS roztoku, jsou hodnoty vyšší než u kontrolní skupiny. Pohybovaly se v rozmezí od 400 do $630\text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$. Nejvyšší hodnoty byly naměřeny u zadečků včel patřících do skupiny stimulované bakteriemi. Výsledky se nacházely v rozmezí $530\text{--}700\text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$. Statistická metoda ANOVA s Bonferroniho post-hoc testem určila, že skupina včel stimulovaných bakteriemi byla signifikantně odlišná od kontrolní skupiny, kdy $p < 0,05$. Zbylé skupiny nebyly vzájemně signifikantně odlišné.



Obrázek 18 Specifická aktivita superoxididismutasy v zadečcích imunizovaných včel, kdy n = 10

Aktivita SOD se zvyšuje s mírou stresu, kterému byly včely vystaveny (Obr. 17 a 18). Aktivita superoxididismutasy v hlavách včel nebyla stanovována. Při prvotních měřeních byla aktivita v této tělní části velmi nízká, v některých případech téměř nulová. V hrudnicích je nižší specifická aktivita nežli u zadečků včel. Vysoká aktivita SOD v zadečcích včel může být ovlivněna tím, že v této tělní části se nachází velká část trávicího ústrojí včel. Potrava včel obsahuje velkou řadu látek s prooxidačními účinky zvyšujícími oxidační stres (Ahmad, 1992). Vysoká aktivita SOD byla také detekována v hemolymfě včel. Jelikož má včela medonosná otevřenou cévní soustavu, hemolymfa se volně rozlévá do všech tělních částí a může tak ovlivnit měřená data (Weirich et al., 2002). Aktivita enzymu SOD může záležet na oblasti, v jaké se včelnice nachází. Bylo prokázáno, že aktivita superoxididismutasy je vyšší u včel pocházejících z hustě obydlených a průmyslových oblastí. Naopak u včel, pocházejících z neznečištěných oblastí, byla naměřená aktivita nižší (Nikolic et al., 2015).

4.4 Stanovení lipidické peroxidace

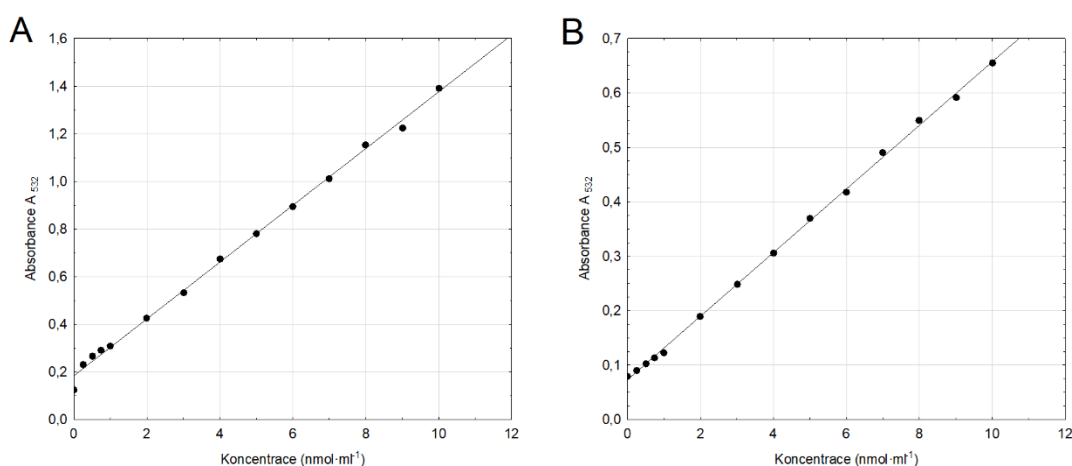
Míra lipidické peroxidace je stanovena jako koncentrace malondialdehydu, což je konečný produkt lipidické peroxidace probíhající v organismu. Koncentrace malondialdehydu byla spočítána pomocí kalibrační rovnice. Samotnému stanovení předcházela vývoj metodiky, který byl sice již popsán v protokolu dle Hodgese (1998), ale byl popsán pro rostliny a s inkubací v mikrozkušnicích.

4.4.1 Vývoj metodiky

Při vývoji metodiky bylo nejdříve pracováno se standardem 1,1,3,3-tetraethoxypropanem (TEP) o koncentracích 0,5–20 nmol·ml⁻¹. Nejprve byl protokol testován v mikrozkušnicovém uspořádání, kdy byl smíchán standard s činidlem A či B v poměru 1:1. Poté byl obsah inkubován v termobloku po dobu 25 minut při 90 °C. Po následném ochlazení byly roztoky napipetovány do mikrodestičky a byla změřena absorbance při vlnové délce 532 nm. Dalším krokem bylo vyzkoušení inkubace přímo v mikrodestičce, kdy byl standard s činidlem A nebo B smíchán přímo v jamkách mikrodestičky, opět v poměru 1:1. Mikrodestička byla přikryta víčkem a inkubována na termotřepačce. Inkubace probíhala opět po dobu 25 minut při 90 °C. Po ochlazení na ledové lázni byla změřena absorbance této kalibrační řady. Graf kalibrace je zobrazen na Obr. 19 (A).

Po proměření kalibrační řady standardů byla věnována pozornost přípravě vzorků. Byly připraveny homogenáty se dvěma druhy extrakčního činidla. Prvním extrakčním činidlem byl 80% ethanol a jako druhé extrakční činidlo bylo využito činidlo A (20% kyselina trichloroctová a 0,01% butyl-hydroxytoluenu). Množství použitých včel na jeden vzorek a objem přidávaného extrakčního činidla bylo taktéž testováno. Množství včel bylo od 1 až po 5 včel na jeden vzorek. Nakonec byla zvolena varianta s 1 včelou ve vzorku s přidáním 750 µl extrakčního činidla. Po sadě měření byl za extrakční činidlo zvolen 80% ethanol. Při použití činidla A vznikala zákal, který následně zvyšoval měřenou absorbanci nad měřitelné hodnoty. U reálných vzorků bylo také zjišťováno optimální ředění. Při měření s danými 100 µl homogenátu dosahovala naměřená absorbance hodnot vyšších než 1. Proto poté byly extrakty 2× ředěny. Při měření bylo také zjištěno, že pyl obsažený v trávicím traktu interferuje při měření, proto byl z dalších vzorků trávicí trakt odstraněn. Po inkubaci takto připravených vzorků

v mikrodestičkách při 90 °C bylo zjištěno, že vysoká teplota znehodnocuje plast mikrodestiček. Při měření kalibrační řady tento problém nenastal, tudíž znehodnocení nejspíše zapříčinila některá z látek obsažených v homogenátu včel nebo ethanol, který sloužil jako extrakční činidlo. Plast jamek získal mléčné zbarvení a dno jamek bylo viditelně poškozeno. Tento problém byl vyřešen snížením teploty inkubace na 60 °C, ale tím pádem prodloužením doby inkubace na 60 minut (Skapova, 2007). Po této optimalizaci byly opět připraveny roztoky kalibrační řady standardu TEP o koncentraci 0,5–20 nmol·ml⁻¹ a po inkubaci při nově stanovených podmínkách byly proměřeny absorbance roztoků. Následně byla sestavena kalibrační přímka a byla vygenerována kalibrační rovnice. Tato kalibrační přímka je zobrazena v grafu (Obr. 19 B).



Obrázek 19 Kalibrační křivka pro stanovení koncentrace malondialdehydu, s koncentračním rozmezím 0,25–10 nmol·ml⁻¹ A) po inkubaci po dobu 25 minut při 90 °C. Rovnice křivky pro přepočet koncentrace je $y = 0,1192x - 0,1841$, $R^2 = 0,997$, za B) po inkubaci po dobu 60 minut při 60 °C. Rovnice křivky pro přepočet koncentrace je $y = 0,0584x - 0,073$, $R^2 = 0,9992$

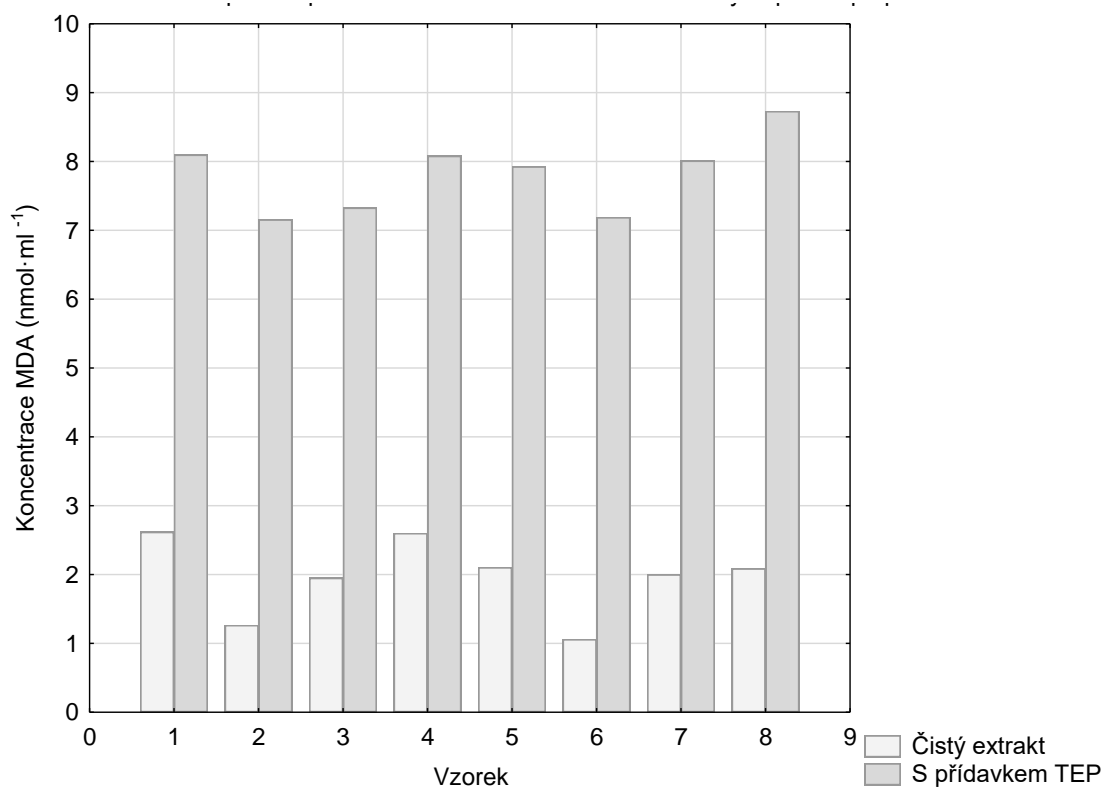
4.4.2 Ověření správnosti měření koncentrace malondialdehydu v reálných vzorcích

Pro ověření správnosti stanovení byly připravené vzorky včel proměřeny a následně byly obohaceny o určité množství standardu TEP. Tento test je založen na zpětné kvantifikaci přidaného standardu. Bylo pracováno se třemi druhy vzorků, a to s koncentrovaným extraktem a pak s 2× a 5× ředěným extraktem. Po proměření absorbancí před i po přidavku standardu malondialdehydu, byly pomocí kalibrační rovnice dopočítány koncentrace. Jejich rozdíl je uveden v Tab. 3. Pomocí programu Statistica byl proveden t-test na střední hodnotu, kterou bylo 6 nmol·ml⁻¹ TEP. Po přidavku standardu do 5× ředěného vzorku nebyl přídavek zpětně pravdivě stanoven (t-test na střední hodnotu, $p < 0,05$). U koncentrovaných a 2× ředěných vzorků bylo možné zpětně stanovit přidané množství TEP. Srovnání směrodatných odchylek ukázalo, že lepší výsledky jsou u vzorků 2× ředěných (Tab. 3).

Tabulka 3 Zpětně stanovená koncentrace TEP v obohacených vzorcích o různých objemech. T-test na střední hodnotu (6 nmol·ml⁻¹) ukazuje, zda jsou hodnoty signifikantně odlišné či ne. Znak \bar{x} vyjadřuje průměrnou koncentraci se směrodatnou odchylkou (s).

Vzorek	Koncentrace přidaného TEP [nmol·ml ⁻¹]		
	25 μ l homogenátu	50 μ l homogenátu	100 μ l homogenátu
1	5,22	5,48	7,35
2	5,77	5,89	5,02
3	5,33	5,38	6,10
4	5,34	5,48	4,88
5	5,46	5,82	4,91
6	5,43	6,13	6,64
7	5,96	6,01	5,65
8	5,84	6,64	5,53
t-test	$p < 0,05$	n.s.	n.s.
\bar{x}	5,54	5,85	5,76
s	1,77	0,59	0,98

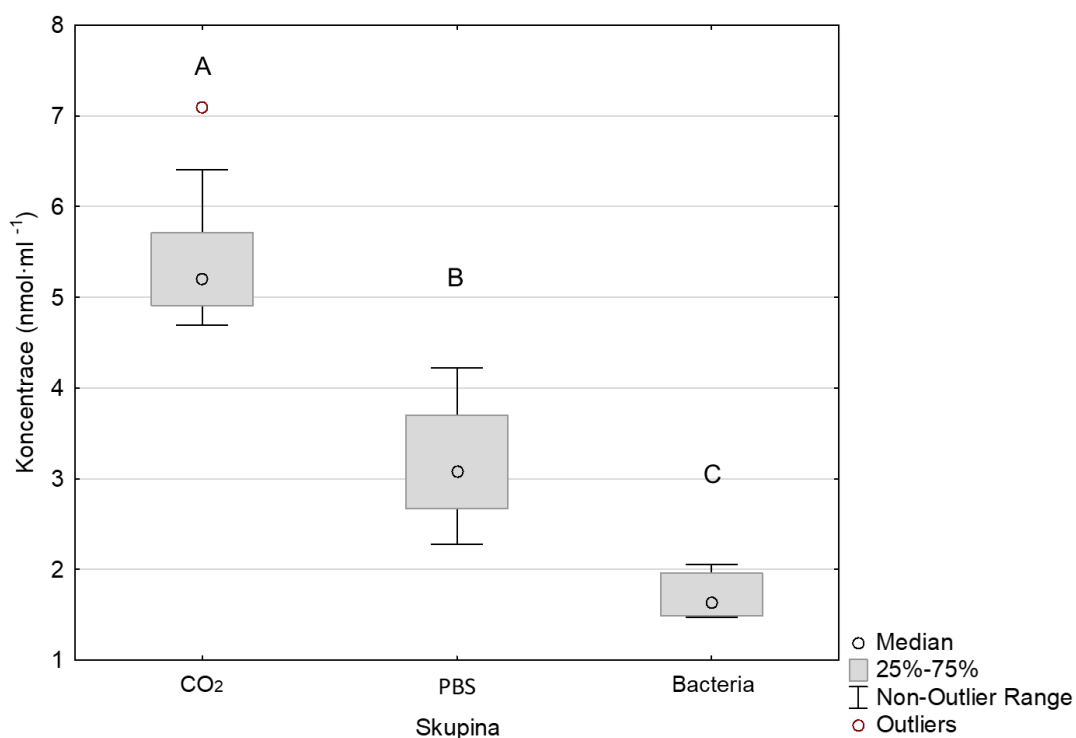
Na základě těchto výpočtů byl sestaven graf (Obr. 20), který porovnává koncentraci malondialdehydu v původním vzorku a ve vzorku obohaceném o standard TEP. V obou skupinách lze vidět stejný trend.



Obrázek 20 Graf ukazující koncentraci malondialdehydu před a po obohacení vzorků o standard TEP

4.4.3 Výsledky měření lipidické peroxidace

Optimalizovanou metodou TBARS byla měřena lipidická peroxidace včel imunizovaných *in vitro*. Včely uspané pomocí CO₂, se koncentrace MDA pohybovala od 4,7 do 6 nmol·ml⁻¹. U skupiny obsahující včely stimulované PBS roztokem nastal pokles koncentrace, kdy výsledné koncentrace byly v rozmezí 2,5–3,7 nmol·ml⁻¹. U poslední skupiny, kde byly včely stimulovány také suspenzí bakterií, došlo k nejvýraznějšímu poklesu koncentrace. Hodnoty se nacházely v úzkém intervalu, a to od 1,5 do 2 nmol·ml⁻¹. Všechny výše uvedené skupiny byly vzájemně signifikantně odlišné, a to na hladině významnosti $p < 0,05$. Výsledky jsou uvedeny v grafu Obr. 21.



Obrázek 21 Koncentrace malondialdehydu u imunizovaných včel, n = 10

U enzymů katalasy a superoxiddismutasy je viditelný trend, kdy s mírou stresu vzrůstá i stanovovaná veličina. Avšak u stanovení lipidické peroxidace měl trend opačnou (klesající) tendenci. V rámci studie z roku 2018 bylo zjištěno, že insekticidy (v jejich případě látka imidacloprid) signifikantně indukují LPO, což se projevilo zvýšením koncentrace malondialdehydu v homogenátech včel (Boas Balieira *et al.*, 2018). Margotta a spol. (2018) potvrdili, že lipidická peroxidace je vysoká nejen u hrudníků včel (díky létacím svalům), ale také v mozcích včel. V této práci se také uvádí, že koncentrace MDA není ovlivněna tím, jestli jsou včely chovány v klíčkách nebo volně (Margotta *et al.*, 2018). Naopak Tolfen a kolegové (2011) prokázali vyšší koncentraci MDA v mozcích včel, které nemohly volně létat (Tolfen *et al.*, 2011).

5 ZÁVĚR

Předmětem teoretické části bakalářské práce bylo vypracovat literární rešerši se zaměřením na reaktivní kyslíkové radikály včely medonosné. V práci byly popsány jak enzymatické, tak i neenzymatické mechanismy vzniku ROS a zároveň byl blíže charakterizován antioxidační systém včel.

V další části byly shrnuty poznatky o včelích patogenech a parazitech a jejich vliv na zdraví včelstev, kdy tato část byla rozdělena na parazitární onemocnění, bakteriózy, virózy včel a houbová onemocnění postihující včely.

Praktická část byla zaměřena na vytvoření profilu specifické aktivity antioxidačního enzymu katalasy v rámci měsíců, kdy byly získány vzorky včel. Nejvyšší specifická aktivita katalasy byla naměřena v zadečcích včel odebraných v měsíci srpnu, kdy se hodnoty pohybovaly v rozmezí 2500–4500 nkat·mg⁻¹. Dále byla stanovena specifická aktivita katalasy ve vzorcích imunizovaných včel, kdy tento experiment prokázal, že aktivita enzymu roste spolu se zvyšujícím se stresem. Nejvyšší specifická aktivita byla naměřena ve vzorcích včel stimulovaných bakteriemi, a to s hodnotami od 3600 do 4600 nkat·mg⁻¹. V rámci práce byl optimalizován protokol pro měření dalšího enzymu s antioxidačními účinky, a to superoxiddismutasy. Byla stanovena specifická aktivita tohoto enzymu u imunizovaných včel. Nejvyšší specifická aktivita SOD byla také u skupiny včel stimulovaných bakteriemi, konkrétně v zadečcích včel se hodnoty pohybovaly v rozmezí 530–700 U·mg⁻¹.

Na závěr, byla testována metoda pro měření lipidické peroxidace u včely medonosné. Tato metodika, vycházející z protokolu Hodgese (1999), byla úspěšně optimalizována. Následně byla stanovena koncentrace malondialdehydu, čímž byla určena i míra lipidické peroxidace ve vzorcích včel z imunizačního experimentu. Se zvyšující se mírou stresu klesala koncentrace malondialdehydu. Tento trend odporuje dosud publikovaným výsledkům, podle nichž úroveň lipidické peroxidace stoupá v závislosti na míře stresu (Boas Balieira *et al.*, 2018).

6 LITERATURA

- Aebi. (1984): Catalase Invitro. *Methods in Enzymology*, **105**, 121-6.
- Ahmad. (1992): Biochemical Defense of Prooxidant Plant Allelochemicals by Herbivorous Insects. *Biochemical Systematics and Ecology*, **20**, 269-96.
- Anjum, Sharma, Gill, Hasanuzzaman, Khan, Kachhap, Mohamed, Thangavel, Devi, Vasudhevan, Sofo, Khan, Misra, Lukatkin, Singh, Pereira, Tuteja. (2016): Catalase and ascorbate peroxidase-representative H₂O₂-detoxifying heme enzymes in plants. *Environmental Science and Pollution Research*, **23**, 19002-29.
- Aronstein a Murray. (2010): Chalkbrood disease in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, **103**, S29.
- Baltacioglu, Akalin, Alver, Deger, Karabulut. (2008): Protein carbonyl levels in serum and gingival crevicular fluid in patients with chronic periodontitis. *Archives of Oral Biology*, **53**, 716-22.
- Barbehenn, Bumgarner, Roosen, Martin. (2001): Antioxidant defenses in caterpillars: role of the ascorbate-recycling system in the midgut lumen. *Journal of Insect Physiology*, **47**, 1095.
- Bedard a Krause. (2007): The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: Physiology and pathophysiology. *Physiological Reviews*, **87**, 245-313.
- Biaglow, Mitchell, Held. (1992): The Importance of Peroxide and Superoxide in the X-Ray Response. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, **22**, 665-9.
- Boas Balieira, Mazzo, Veiga Bizerra, de Jesus Santos Guimares, A. R., Nicodemo, Mingatto. (2018): Imidacloprid-induced oxidative stress in honey bees and the antioxidant action of caffeine. *Apidologie*, **49**, 562-72.
- Bohm, Edge, Land, McGarvey, Truscott. (1997): Carotenoids enhance vitamin E antioxidant efficiency. *Journal of the American Chemical Society*, **119**, 621-2.
- Bradford. (1976): Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-54.
- Brutscher, Daughenbaugh, Flenniken. (2015): Antiviral defense mechanisms in honey bees. *Current Opinion in Insect Science*, **10**, 71-82.
- Carocho a Ferreira. (2013): A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, **51**, 15-25.
- Chaimanee, Chantawannakul, Chen, Evans, Pettis. (2012): Differential expression of immune genes of adult honey bee (*Apis mellifera*) after inoculated by *Nosema ceranae*. *Journal of Insect Physiology*, **58**, 1090-5.
- Chelikani, Fita, Loewen. (2004): Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **61**, 192-208.
- Cheng, Cao, Xu, Van Meir, Lambeth. (2001): Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Gene*, **269**, 131-40.
- Choi, Lee, Kim, Jin. (2005): Thrombin-induced oxidative stress contributes to the death of hippocampal neurons in vivo: Role of microglial NADPH oxidase. *Journal of Neuroscience*, **25**, 4082-90.
- Cooper, Khosravan, Erdmann, Fiene, Lee. (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*, **837**, 1-10.
- Corona a Robinson. (2006): Genes of the antioxidant system of the honey bee: annotation and phylogeny. *Insect Molecular Biology*, **15**, 687-701.
- Danihlik, Aronstein, Petrivalsky. (2015): Antimicrobial peptides: a key component of honey bee innate immunity Physiology, biochemistry, and chemical ecology. *Journal of Apicultural Research*, **54**, 123-36.
- Denisov a Afanas'ev. (2005): *Oxidation and Antioxidants in Organic Chemistry and Biology*. 1st Edition, CRC Press, 1024.

- Djovkar a Kappus. (1985): Lipid-Peroxidation Induced by an Adriamycin-Fe Complex and Nadph-Cytochrome-P-450 Reductase. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, **109**, A6.
- Ebeling, Knispel, Hertlein, Fuenfhaus, Genersch. (2016): Biology of Paenibacillus larvae, a deadly pathogen of honey bee larvae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **100**, 7387-95.
- Erban, Ledvinka, Kamler, Hortova, Nesvorna, Tyl, Titera, Markovic, Hubert. (2017): Bacterial community associated with worker honey bees (*Apis mellifera*) affected by European foulbrood. *Peerj*, **5**, e3816.
- Ernst, O. a Zor, T., 2010. *Linearization of the Bradford Protein Assay*. , /04/12.,
- Felton a Summers. (1995): Antioxidant Systems in Insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **29**, 187-97.
- Forstermann a Munzel. (2006): Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease - From marvel to menace. *Circulation*, **113**, 1708-14.
- Francis, Nielsen, Kryger. (2013): Varroa-Virus Interaction in Collapsing Honey Bee Colonies. *Plos One*, **8**, e57540.
- Fridovich. (2004): Mitochondria: are they the seat of senescence? *Aging Cell*, **3**, 13-6.
- Fries. (2010): Nosema ceranae in European honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology*, **103**, S79.
- Fujii, Iuchi, Okada. (2005): Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system. *Reproductive Biology and Endocrinology*, **3**, 43.
- Goulson, Nicholls, Botias, Rotheray. (2015): Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*, **347**, 1255957.
- Granger. (1988): Role of Xanthine-Oxidase and Granulocytes in Ischemia-Reperfusion Injury. *American Journal of Physiology*, **255**, H1275.
- Halliwell a Gutteridge. (1999): Free radicals in biology and medicine.
- He, Su, Sun-Waterhouse, Waterhouse, Zhao, Liu. (2019): In vivo anti-hyperuricemic and xanthine oxidase inhibitory properties of tuna protein hydrolysates and its isolated fractions. *Food Chemistry*, **272**, 453-61.
- Heath a Packer. (1968): Photoperoxidation in Isolated Chloroplasts .I. Kinetics and Stoichiometry of Fatty Acid Peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **125**,.
- Hodges, DeLong, Forney, Prange. (1999): Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, **207**, 604-11.
- Huang. (2012): Pollen nutrition affects honey bee stress resistance. *Terrestrial Arthropod Reviews* **5**, 175-89.
- Ishii, Fujii, Hartman, Tsuda, Yasuda, Senoo-Matsuda, Yanase, Ayusawa, Suzuki. (1998): A mutation in succinate dehydrogenase cytochrome b causes oxidative stress and ageing in nematodes. *Nature*, **394**, 694-7.
- James a Xu. (2012): Mechanisms by which pesticides affect insect immunity. *Journal of Invertebrate Pathology*, **109**, 175-82.
- Kodíček. (2018): *Biochemie - chemický pohled na biologický svět*. 2nd edition, vydavatelství VŠCHT, .
- Kodrik, Bednarova, Zemanova, Krishnan. (2015): Hormonal Regulation of Response to Oxidative Stress in Insects-An Update. *International Journal of Molecular Sciences*, **16**, 25788-816.
- Krinsky a Yeum. (2003): Carotenoid-radical interactions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **305**, 754-60.
- Lamb a Waterman. (2013): Unusual properties of the cytochrome P450 superfamily. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, **368**, 20120434.
- Ledvina, Stoklasova, Cerman. (2009): *Biochemie pro studující medicínu*. 2, Karolinum, 546.

- Li-Byarlay, Huang, Simone-Finstrom, Strand, Tapy, Rueppell. (2016): Honey bee (*Apis mellifera*) drones survive oxidative stress due to increased tolerance instead of avoidance or repair of oxidative damage. *Experimental Gerontology*, **83**, 15-21.
- Locke a Fries. (2011): Characteristics of honey bee colonies (*Apis mellifera*) in Sweden surviving *Varroa destructor* infestation. *Apidologie*, **42**, 533-42.
- Margotta, Roberts, Elekonich. (2018): Effects of flight activity and age on oxidative damage in the honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Experimental Biology*, **221**,.
- Marklund a Marklund. (1974): Involvement of Superoxide Anion Radical in Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide-Dismutase. *European Journal of Biochemistry*, **47**, 469-74.
- Mates, Perez-Gomez, De Castro. (1999): Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry*, **32**, 595-603.
- Mathews, Summers, Felton. (1997): Ascorbate peroxidase: A novel antioxidant enzyme in insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **34**, 57-68.
- Matouskova, Bartikova, Bousova, Szotakova, Martin, Skorkovska, Hanusova, Tomankova, Anzenbacherova, Liskova, Anzenbacher, Skalova. (2014): Effect of defined green tea extract in various dosage schemes on drug-metabolizing enzymes in mice in vivo. *Journal of Functional Foods*, **10**, 327-35.
- Mittler, Vanderauwera, Suzuki, Miller, Tognetti, Vandepoele, Gollery, Shulaev, Van Breusegem. (2011): ROS signaling: the new wave? *Trends in Plant Science*, **16**, 300-9.
- Miwa, Beckman, Muller. (2008): *Oxidative Stress in Aging: From Model Systems to Human Diseases*. Humana Press, 11-35.
- Morgan a Liu. (2011): Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kappa B signaling. *Cell Research*, **21**, 103-15.
- Nikolic, Purac, Orcic, Kojic, Vujanovic, Stanimirovic, Grzetic, Ilijevic, Sikoparija, Blagojevic. (2015): Environmental Effects on Superoxide Dismutase and Catalase Activity and Expression in Honey Bee. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **90**, 181-94.
- Ohara, Peterson, Harrison. (1993): Hypercholesterolemia Increases Endothelial Superoxide Anion Production. *Journal of Clinical Investigation*, **91**, 2546-51.
- Payne. (2017): *Viruses*. 1st Edition, Academic Press, .
- Peng, Zhao, Wang, Song, Shangguan, Ma, Zhu, He. (2017): Functional Study of Cytochrome P450 Enzymes from the Brown Planthopper (*Nilaparvata lugens* Stal) to Analyze Its Adaptation to BPH-Resistant Rice. *Frontiers in Physiology*, **8**, 972.
- Perkins a Gilmore. (2006): Good cop, bad cop: the different faces of NF-kappa B. *Cell Death and Differentiation*, **13**, 759-72.
- Racek a Holecek. (1999): Enzymes and free radicals. *Chemicke Listy*, **93**, 774-80.
- Randolt, Gimple, Geissendoerfer, Reinders, Prusko, Mueller, Albert, Tautz, Beier. (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*, **69**, 155-67.
- Reynaert, van der Vliet, Guala, McGovern, Hristova, Pantano, Heintz, Heim, Ho, Matthews, Wouters, Janssen-Heininger. (2006): Dynamic redox control of NF-kappa B through glutaredoxin-regulated S-glutathionylation of inhibitory kappa B kinase beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 13086-91.
- Ryabov, Fannon, Moore, Wood, Evans. (2016): The Iflaviruses Sacbrood virus and Deformed wing virus evoke different transcriptional responses in the honeybee which may facilitate their horizontal or vertical transmission. *Peerj*, **4**, e1591.
- Shimanuki, Calderone, Knox. (1994): Parasitic Mite Syndrome - the Symptoms. *American Bee Journal*, **134**, 827-8.
- Skalicka, Zoelzer, Beranek, Racek. (2012): Indicators of oxidative stress after ionizing and/or non-ionizing radiation: Superoxid dismutase and malondialdehyde. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, **117**, 111-4.

- Skapova, P. 2007. *Metody stanovení peroxidace lipidů v rostlinném pletivu*. Bakalářská práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Česká republika.
- Steenvoorden a van Henegouwen. (1997): The use of endogenous antioxidants to improve photoprotection. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, **41**, 1-10.
- Stiborova, Hudecek, Hodek, Frei. (1999): Cytochromes P450 and human health. *Chemicke Listy*, **93**, 229-37.
- Suarez, Staples, Lighton. (1999): Turnover rates of mitochondrial respiratory chain enzymes in flying honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of Experimental Zoology*, **284**, 1-6.
- Tan, Norhaizan, Liew, Rahman. (2018): Antioxidant and Oxidative Stress: A Mutual Interplay in Age-Related Diseases. *Frontiers in Pharmacology*, **9**, 1162.
- Tang, Long, Liu. (2014): *Hyperglycemia-Associated Oxidative Stress Induces Autophagy: Involvement of the ROS-ERK/JNK-p53 Pathway*. ELSEVIER ACADEMIC PRESS INC, SAN DIEGO; 525 B STREET, SUITE 1900, SAN DIEGO, CA 92101-4495 USA, 115.
- Tentcheva, Gauthier, Zappulla, Dainat, Cousserans, Colin, Bergoin. (2004): Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* mite populations in France. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**, 7185-91.
- Tolfsen, Baker, Kreibich, Amdam. (2011): Flight restriction prevents associative learning deficits but not changes in brain protein-adduct formation during honeybee ageing. *Journal of Experimental Biology*, **214**, 1322-32.
- Tsang, Bowler, Herouart, Vancamp, Villarroel, Genetello, Vanmontagu, Inze. (1991): Differential Regulation of Superoxide Dismutases in Plants Exposed to Environmental-Stress. *Plant Cell*, **3**, 783-92.
- Veselý. (2007): *Včelařství*. Brázda, .
- Weirich, Collins, Williams. (2002): Antioxidant enzymes in the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie*, **33**, 3-14.
- Wolfe-Simon, Starovoytov, Reinfelder, Schofield, Falkowski. (2006): Localization and role of manganese superoxide dismutase in a marine diatom. *Plant Physiology*, **142**, 1701-9.
- Young a Lowe. (2001): Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **385**, 20-7.
- Zamocky a Koller. (1999): Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*, **72**, 19-66.
- Zelko, Mariani, Folz. (2002): Superoxide dismutase multigene family: A comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology and Medicine*, **33**, 337-49.
- Zheng, Gong, Huang, Sohr, Hu, Chen. (2015): Evidence of the synergistic interaction of honey bee pathogens *Nosema ceranae* and Deformed wing virus. *Veterinary Microbiology*, **177**, 1-6.

7 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ABPV	virus akutní paralýzy včel
AmP	antimikrobiální peptidy
ANOVA	Analysis of variance
APX	askorbátperoxidasa
BQCV	virus černání matečnicků
BSA	hovězí sérový albumin
CAR	karotenoid
CAT	enzym katalasa
CBPV	virus chronické paralýzy včel
CuZnSOD	superoxiddismutasa s kovovými kofaktory mědi a zinkem
DHA	dehydroaskorbát
Duox 1	dualní oxidasa 1
Duox 5	dualní oxidasa 5
DWV	virus deformovaných křídel
EC-SOD	extracelulární superoxiddismutasa
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ER	endoplasmatické retikulum
FeSOD	železnatá isoforma superoxiddismutasy
GSH	glutathion
GSSG	dimer glutathionu
IMD dráha	immune deficiency signalizační dráha
IκB	inhibitor kappa B
KBV	Kašmírský virus
LPO	lipidická peroxidace

MDA	malondialdehyd.
MnSOD	superoxiddismutasa s manganem jako kofaktorem
NF- κ B	nukleární faktor kappa B
Nox 1-5	NADPH-oxidasa 1-5
PBS	fosfátem pufovaný fyziologický roztok
ROS	reaktivní formy kyslíku
SOD	superoxiddismutasa
TBA	kyselina thiobarbiturová
TBARS metoda	thiobarbituric acid reactive substances method
TEP	1,1,3,3- tetraethoxypropan
UV	ultrafialové světlo
XO	xantinoidasa

PŘÍLOHA P I: VÝPOČET SPECIFICKÉ AKTIVITY KATALASY

Výpočet aktivity katalasy

$$l = \frac{A_{977} - A_{900}}{0,18}$$

$$\bar{l} = \frac{l_1 + l_2 + l_3}{3}$$

$$\Delta A = A_{t0} - A_{t1}$$

$$\Delta \bar{A} = \frac{\Delta A_1 + \Delta A_2 + \Delta A_3}{3}$$

$$b = \frac{(\Delta \bar{A} \cdot V_j)}{t \cdot \varepsilon \cdot \bar{l}}$$

$$a = b \cdot 10^9$$

$$a_{vz} = \frac{V_h}{V_{vz}} \cdot a$$

l = optická dráha [cm]

ΔA = rozdíl absorbancí

A_{t0} = absorbance v čase $t = 0$

A_{t1} = absorbance v čase $t = 60$ s

b = celková aktivita v jamce [kat]

V_j = objem v jamce [l]

t = doba reakce [s]

ε = extinkční koeficient [$l \cdot (M \cdot cm)^{-1}$]

a = celková aktivita v jamce [nkat]

a_{vz} = celková aktivita ve vzorku [nkat]

V_h = objem homogenátu [μ l]

V_{vz} = objem vzorku [μ l]

Výpočet koncentrace proteinů

$$\tilde{c} = c \cdot f$$

$$p = \frac{V_h \cdot \tilde{c}}{10^3}$$

\tilde{c} = proteiny ve vzorku [μ g·ml⁻¹]

c = proteiny v jamce [μ g·ml⁻¹]

f = ředící faktor

p = celkové proteiny [mg]

V_h = objem homogenátu [μ l]

Výpočet specifické aktivity katalasy

$$s = \frac{a_{vz}}{p}$$

s = specifická aktivita [nkat·mg⁻¹]

PŘÍLOHA P II: VÝPOČET SPECIFICKÉ AKTIVITY SUPEROXIDDISMUTASY

Výpočet aktivity superoxiddismutasy

$$dA_5 = A_5 - A_1$$

$$dA_1 = \frac{dA_5}{5}$$

$$o_1 = \frac{dA_{1vz}}{dA_{1kon}} \cdot 100\%$$

$$\bar{o} = \frac{o_1 + o_2 + o_3}{3}$$

$$I = 100 - \bar{o}$$

$$a_v = \frac{I}{50}$$

$$a_{vf} = a_v \cdot f$$

$$a = \frac{a_{vf} \cdot V_h}{V_{vz}}$$

A_5 = absorbance v čase t_5 min

A_1 = absorbance v čase t_0

dA_5 = změna absorbance za 5 minut

dA_1 = změna absorbance za 1 minutu

o_1 = autooxidace pyrogallolu [%]

\bar{o} = průměr hodnot autooxidace [%]

I = inhibice [%]

a_v = vztažená aktivita

a_{vf} = vztažená aktivita · ředící faktor

f = ředící faktor

a = celková aktivita ve vzorku [U]

V_h = objem homogenátu

V_{vz} = objem pipetovaného vzorku

Výpočet koncentrace proteinů

$$\tilde{c} = c \cdot f$$

$$p = \frac{\tilde{c} \cdot V_h}{10^3}$$

\tilde{c} = koncentrace proteinů · ředící faktor [$\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$]

c = koncentrace proteinů [$\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$]

f = ředící faktor

p = celková koncentrace proteinů [mg]

V_h = objem homogenátu [ml]

Výpočet specifické aktivity superoxiddismutasy

$$s = \frac{a}{p}$$

a = celková aktivita v homogenátu

s = specifická aktivita [$\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$]