

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Biologicky aktivní látky včelího jedu

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Eva Kořenková
Studijní program:	Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Martina Janků, Ph.D.
Rok:	2023

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/a s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

Poděkování

Mé poděkování patří Mgr. Martině Janků, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnovala.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Eva Kořenková
Název práce	Biologicky aktivní látky včelího jedu
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Martina Janků, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2023

Abstrakt

Tato práce se v teoretické části zabývá využitím včelích produktů v apiterapii. Popisuje nejvýznamnější včelí produkty, jež jsou člověkem hojně využívány při léčbě řady onemocnění, v kosmetickém průmyslu i při výrobě potravinových doplňků. Značná část je věnována včelímu jedu a jeho nejvýznamnějším biologicky aktivním látkám, včetně popisu jejich hlavních biologických účinků a jejich možného využití pro terapeutické účely.

V experimentální části práce jsou testovány antimikrobiální účinky včelího jedu na vybraných mikroorganismech; *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Pichia pastoris* a *Paenibacillus larvae*. Rovněž byly zkoumány antimikrobiální účinky jedné z majoritních složek včelího jedu, tedy peptidu melittinu. Pro tuto práci byl využit melittin syntetický. Dané antimikrobiální účinky byly testovány difúzními testy a dále analýzou růstových křivek testovaných mikroorganismů. V rámci práce byl potvrzen silnější antimikrobiální účinek vůči grampozitivním bakteriím, tj. *M. luteus* a *P. larvae*. Jako poslední byly v rámci experimentální části testovány hemolytické účinky včelího jedu, melittinu a vybraných mikroorganismů. Byly potvrzeny hemolytické účinky včelího jedu, melittinu, *M. luteus*, *E. coli* a *P. larvae*.

Klíčová slova	Apiterapie, <i>Apis mellifera</i> , včelí jed, melittin, antimikrobiální účinky
Počet stran	81
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Eva Kořenková
Title	Biologically active compounds of bee venom
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Martina Janků, Ph.D.
The year of presentation	2023

Abstract

The theoretical part of the thesis is focused on the use of bee products in apitherapy. It describes the most important bee products widely used by people for the treatment of several diseases, in the cosmetic industry and in the production of food supplements. A considerable part is devoted to bee venom and its most important biologically active compounds, including the description of their main biological effects and their possible use for therapeutic purposes. In the experimental part of the thesis, the antimicrobial effects of bee venom were tested on selected microorganisms, namely *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Pichia pastoris* and *Paenibacillus larvae*. The antimicrobial effects of one of the major components of bee venom, the peptide melittin, were also analyzed. Synthetic melittin was used for this study. The antimicrobial effects were tested using diffusion tests and analysis of growth curves of tested microorganisms. Results confirmed a stronger antimicrobial effect against gram-positive bacteria, i.e. *M. luteus* and *P. larvae*. Hemolytic effects of bee venom, melittin and selected microorganisms were also tested in the experimental part. Hemolytic effects of bee venom, melittin, *M. luteus*, *E. coli* and *P. larvae* have been confirmed.

Keywords	Apitherapy, <i>Apis mellifera</i> , bee venom, melittin, antimicrobial effects
Number of pages	81
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

1 Úvod	1
2 Současný stav řešené problematiky	3
2.1 Apiterapie	3
2.1.1 Produkty využívané v apiterapii.....	3
2.1.1.1 Včelí jed	3
2.1.1.2 Propolis.....	5
2.1.1.3 Med.....	6
2.1.1.3 Mateří kašička	7
2.1.1.4 Další produkty využívané v apiterapii	9
2.1.2 Využití apiterapie	9
2.2 Biologicky aktivní látky včelího jedu	10
2.2.1 Melittin	11
2.2.1.1 Interakce melittinu s fosfolipidovou dvojvrstvou	11
2.2.1.2 Protizánětlivé účinky	13
2.2.1.3 Antivirové účinky melittinu	15
2.2.2 Apamin	15
2.2.3 Peptid degranulující žírné buňky	16
2.2.4 Adolapin	17
2.2.5 Secapin	17
2.2.6 Vitellogenin	17
2.2.7 Fosfolipasa A2.....	18
2.2.7.1 Interakce bvPLA2 s fosfolipidovou membránou	18
2.2.7.2 Fosfolipasa A2 jako ligand.....	21
2.2.8 Hyaluronidasa.....	21
2.3 Metody izolace melittinu ze surového včelího jedu.....	22
2.4 Studium antimikrobiálních účinků včelího jedu a melittinu	24

3 Experimentální část	26
3.1 Materiál	26
3.1.1 Chemikálie.....	26
3.1.2 Biologický materiál	26
3.1.3 Přístroje a vybavení	26
3.1.4 Použitá média a roztoky	27
3.2 Metody.....	27
3.2.1 Příprava zásobních a pracovních roztoků včelího jedu a melittinu.....	27
3.2.2 Oživování zálohovaných bakteriálních kultur.....	27
3.2.3 Určení kolonie tvořící jednotky.....	28
3.2.4 Očkování média testovaným mikroorganismem.....	28
3.2.5 Testování antimikrobiální aktivity VJ pomocí difúzních testů	29
3.2.5.1 Aplikace antimikrobiální látky v podobě papírových disků	29
3.2.5.2 Aplikace antimikrobiální látky do jamek v pevném médiu	29
3.2.5.3 Aplikace antimikrobiální látky přímo na misku.....	29
3.2.6 Stanovení růstové křivky mikroorganismů	30
3.2.7 Testování hemolytických účinků včelího jedu a melittinu.....	30
3.2.8 Testování hemolytických účinků testovaných mikroorganismů.....	31
4 Výsledky a vyhodnocení	32
4.1 Určení kolonie tvořící jednotky.....	32
4.1.1 Určení kolonie tvořící jednotky pro <i>M. luteus</i> CCM 732.....	32
4.1.2 Určení kolonie tvořící jednotky pro <i>E. coli</i> CCM 7395	34
4.1.3 Určení kolonie tvořící jednotky pro <i>P. larvae</i> CCM 4483	36
4.1.4 Určení kolonie tvořící jednotky pro <i>P. larvae</i> CCM 4484	38
4.1.5 Určení kolonie tvořící jednotky pro <i>P. pastoris</i> CCM X-33.....	40
4.2 Testování antimikrobiálních účinků včelího jedu a melittinu	42
4.2.1 Difúzní testy	42

4.2.1.1 Difúzní testy včelího jedu a melittinu vůči <i>M. luteus</i> CCM 732	45
4.2.1.2 Difúzní testy včelího jedu a melittinu vůči <i>E. coli</i> CCM 7395	47
4.2.1.3 Difúzní testy včelího jedu a melittinu vůči <i>P. larvae</i> CCM 4483 a <i>P. larvae</i> CCM 4484	49
4.2.1.4 Difúzní testy včelího jedu a melittinu vůči <i>P. pastoris</i> CCM X-33....	52
4.2.1.5 Porovnání difúzních testů	54
4.2.2 Stanovení růstových křivek testovaných mikroorganismů v přítomnosti včelího jedu	56
4.2.2.1 Stanovení růstové křivky <i>M. luteus</i> CCM 732 v přítomnosti včelího jedu.....	57
4.2.2.2 Stanovení růstové křivky <i>E. coli</i> CCM 7395 v přítomnosti včelího jedu	58
4.2.2.3 Stanovení růstové křivky <i>P. larvae</i> CCM 4483 v přítomnosti včelího jedu.....	59
4.2.2.4 Stanovení růstové křivky <i>P. larvae</i> CCM 4484 v přítomnosti včelího jedu.....	61
4.2.2.5 Stanovení růstové křivky <i>P. pastoris</i> CCM X-33 v přítomnosti včelího jedu.....	62
4.2.2.6 Analýza spektrálních vlastností včelího jedu a melittinu v čase	64
4.2.2.7 Absorpční spektrum včelího jedu a melittinu	65
4.3 Hemolytické účinky včelího jedu a melittinu	66
4.4 Hemolytické účinky vybraných mikroorganismů	68
5 Závěr	70
6 Literatura	72
7 Seznam zkratek	80

Cíle práce

Teoretická část:

- Shrnutí základních poznatků o apiterapii a jejím významu
- Charakteristika včelího jedu a jeho biologicky aktivních složek
- Popis metod izolace melittinu ze surového včelího jedu
- Možnosti studia antimikrobiálních účinků včelího jedu/melittinu

Experimentální část:

- Příprava mikrobiálních kultur pro testování antimikrobiálních účinků
- Testování antimikrobiálních účinků včelího jedu vůči gram pozitivním, gram negativním bakteriím a kvasinkám pomocí základních metod testování antimikrobiální aktivity
- Analýza hemolytických účinků včelího jedu
- Porovnání antimikrobiálních a hemolytických účinků melittinu s komplexním včelím jodem vůči vybraným skupinám mikroorganismů

1 Úvod

Apiterapie je populární metodou komplementární a alternativní medicíny, která při svých postupech využívá včely medonosné (*Apis mellifera*) a jejich produktů, mezi něž patří včelí jed, med, mateří kašička, propolis a další. O příznivých účincích těchto produktů se ví více než tisíc let a jsou o nich dokonce zmínky v některých náboženských textech. Tyto produkty jsou hojně užívány při léčení různých nemocí již od dob antického Řecka. V současné době se výzkum mimo jiné zabývá možnostmi využití včelích produktů pro léčbu některých onemocnění centrální nervové soustavy (např. Parkinsonova a Alzheimerova choroba), revmatoidní artritidy a některých druhů rakoviny (Wehbe et al., 2019).

Včelí jed, též znám jako apisin nebo apitoxin, je látka produkovaná jedovými žlázami samic včely medonosné. Je to jeden ze včelích produktů, který má využití v apiterapii. Jeho složení je velmi složité; obsahuje látky peptidové či proteinové povahy, např. melittin nebo fosfolipasa A2 ze včelího jedu, bioaktivní aminy a některé minerály. Včely svůj jed využívají k obraně proti predátorům. Jeho úkolem je atakující organismus paralyzovat či přímo usmrtit. Jeho nejznámějšími účinky na lidský organismus jsou otoky, bolest, zarudnutí a v některých případech alergická reakce, která může přejít až v anafylaktický šok. Světová alergologická organizace označila včelí jed za jednu z nejčastějších příčin alergií, které mohou vést k anafylaktickému šoku (Burzyńska & Piasecka-Kwiatkowska, 2021).

Přesto je však známo, že aplikace včelího jedu do lidského těla může mít i příznivý vliv, třeba snížený výskyt artritidy u včelařů, kteří jsou včelímu jedu běžně vystavováni. Využitím včelího jedu při léčbě revmatoidní artritidy se zabýval už lékař českého původu Filip Terč, který je považován za průkopníka moderní apiterapie. Vědci proto začali zkoumat složení včelího jedu a jeho jednotlivé složky a jejich účinky na lidský organismus (Münstedt & Männle, 2020).

Jednou ze biologicky aktivních složek včelího jedu je melittin, peptid, který je složen z 26 aminokyselin. Je amfipatického charakteru, a proto je dobře rozpustný ve vodě. Tato vlastnost je také zodpovědná za interakce melittinu s fosfolipidovou dvojvrstvou, kterou je schopen narušit, což jej dělá cytotoxickým. Melittin je ve fosfolipidové dvojvrstvě buněčných membrán schopen vytvořit póry. V závislosti na velikosti vznikajících pórů dochází k propouštění iontů či i větších molekul, následkem čehož se buněčný obsah vyléje ven a buňka umírá (Wehbe et al., 2019).

Cytotoxicita melittinu ale není dána pouze schopností tvořit póry. Bylo zjištěno, že melittin dokáže v buňkách indukovat apoptózu. Tento fakt z něj dělá potenciální léčivo rakoviny (Park et al., 2011)

V souvislosti s cytotoxicitou jsou často studovány rovněž antimikrobiální účinky jak včelího jedu, tak melittinu samotného. Jak včelí jed, tak melittin vykazují vysokou antimikrobiální aktivitu i vůči některým rezistentním druhům mikroorganismů, mezi něž patří třeba methicilin—rezistentní *Staphylococcus aureus*, též znám jako MRSA, který je znám svým výskytem ve zdravotnických zařízeních, kde způsobuje špatně léčitelné infekce. Vzhledem k tomuto faktu se do budoucna tedy naskýtá možnost produkce nových léčiv nahrazujících či doplňujících stávající antibiotika, která by byla účinná i proti rezistentním druhům bakterií (Choi et al., 2015; Sameh et al., 2023).

2 Současný stav řešené problematiky

2.1 Apiterapie

Apiterapie je populární léčebná metoda, která se zabývá využitím včely medonosné (*Apis mellifera*) a jejích produktů (med, propolis, mateří kašička, včelí jed apod.). Je to jedna z metod komplementární a alternativní medicíny (angl. Complementary and alternative medicine, CAM), podobně jako akupunktura či akvaterapie (Tesio, 2013). CAM využívá produktů a praktik, které nejsou součástí konvenční medicíny, ale spíše pramení ze starobylých zkušeností. Metody CAM, jak vypovídá název, mohou být využity spolu s metodami klasické západní medicíny, nebo jako jejich náhrada. U některých metod CAM se však prokázala jejich bezpečnost a efektivita, a tak byly přijaty jako běžné zdravotnické praktiky (např. chiropraxe) (Tabish, 2008). Většina metod CAM ovšem působí především jako placebo a působí při potížích vyvolaných psychosomatikou. Také neexistuje dostatek kontrolovaných studií, které by potvrdily slibovaný účinek některých metod a jejich specifickou účinnost (Beneš, 2021).

Základním předpokladem apiterapie je, že všechny nemoci mohou být vyléčeny pomocí včelích produktů (Münstedt & Männle, 2020). Apiterapie je známá a využívána v různých formách již tisíce let. Předpokládá se, že ji nevědomě praktikovali už primitivní lidé rodu *Homo*, když je pobodaly včely (Weis et al., 2022). O příznivých účincích včelích produktů jsou zmínky již ve starých náboženských textech, například Bibli, Koránu a Védách (Ali, 2012). Dnes je apiterapie jedna z nejznámějších metod alternativní medicíny a během posledního desetiletí se objevil zájem tuto metodu zkoumat podrobněji, případně potvrdit, respektive vyvrátit tvrzení o tradovaných účincích včelích produktů.

2.1.1 Produkty využívané v apiterapii

2.1.1.1 Včelí jed

Včelí jed, dále VJ, též znám jako apitoxin nebo apisin, je látka produkována samičkami včely medonosné, tzv. dělnicemi, a dále včelími matkami, jež jej využívají k boji s jinými matkami (Danneels et al., 2015). Jedná se o roztok, který kromě vody obsahuje směs látek proteinového a peptidového charakteru (např. melittin), enzymů - např. fosfolipasa A2 ze včelího jedu, angl. bee venom phospholipase A2 (bvPLA2, fosfatidylcholin 2-acylhydrolasa, EC 3.1.1.4)), bioaktivních aminů (např. histamin) a minerálů (Wehbe et

al., 2019). Primárně slouží jako obrana proti predátorům, které má za úkol paralyzovat či rovnou usmrtit. Je sekretován jedovou žlázou a bodnutí je nejčastěji zprostředkováno žihadlem. Alternativně se dá jed aplikovat pomocí injekce, ovšem tomu musí předcházet extrakce jedu z těla včely. U člověka jed po bodnutí způsobuje alergické reakce, které ve většině případů vedou k otokům a podráždění kůže, avšak není vyloučeno postižení dýchacích cest, trávicího traktu a kardiovaskulárního systému. Ve vážnějších případech může dojít k anafylaktickému šoku, jenž by mohl vést k mozkové nebo srdeční ischemii. Podle Světové alergologické organizace (World Allergy Organization, WAO) je VJ jednou z nejčastějších příčin alergií, které mohou vést k anafylaktickému šoku (Burzyńska & Piasecka-Kwiatkowska, 2021).

Včelí jed může být do těla vpraven samotným bodnutím nebo nepřímou aplikací. Dokonce i požití či zasažení očí může způsobit podráždění. Mezi hlavní alergeny patří enzymy bvPLA2 a hyaluronidasa (hyaluronát 4-glykanohydrolasa, EC 3.2.1.35), které indukují tvorbu specifických IgE protilátek (Burzyńska & Piasecka-Kwiatkowska, 2021).

V současné době je velká pozornost směřována ke včelímu jedu a k jeho využití při terapii různých onemocnění, např. onemocnění nervové soustavy (především Parkinsonova choroba, Alzheimerova choroba a amyotrofická laterální skleróza) (Cho et al., 2012; Moreno & Giralt, 2015; Wehbe et al., 2019). Mimo tyto nemoci je apiterapie využívána při léčbě revmatoidní artritidy (Lee et al., 2014). Využitím včelího jedu při léčbě revmatoidní artritidy se zabýval lékař českého původu Filip Terč, jenž je považován za zakladatele moderní apiterapie (Pivec, 2017). Dnes je na trhu řada komerčních výrobků, které obsahují včelí produkty. Zajímavý je například přípravek Apitox® (Apimeds, Inc., Seongnam-si, Korea), čistý VJ, který byl schválen Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (U.S. Food and Drug Administration). Mezi jeho účinky patří zmírnění otoků a bolestí způsobených revmatoidní artritidou, zánětu šlach a zánětu tíhového vřáku (Moreno & Giralt, 2015). V České republice zatím není dostupný.

VJ je rovněž zkoumán pro možnost využití při léčbě různých typů rakoviny. Během studia účinku včelího jedu na buňky rakoviny vaječníků a prostaty (Jo et al., 2012; Park et al., 2011) bylo prokázáno, že jed u některých kancerózních buněk navodí apoptózu jak *in vitro*, tak *in vivo* (Park et al., 2011). Tento efekt závisí na koncentraci VJ. Bylo zjištěno, že apoptóza byla vyvolaná zvýšením exprese receptorů smrti (death receptor, DR) a inhibicí přenašeče signálu a transkripčního faktoru STAT3 (signal transducer and activator of transcription), tedy zásahem do JAK/STAT signální dráhy. Při dalších

studiích bylo zjištěno, že apoptóza byla vyvolána i zvýšením exprese DR a inhibicí nukleárního faktoru kappa B (NF- κ B) (Zheng et al., 2015; Park et al., 2011).

V neposlední řadě je pro výzkum důležitý i fakt, že VJ působí antimikrobiálně (Carter et al., 2013). Některé jeho složky (melittin, bvPLA2) mají schopnost narušit integritu fosfolipidové dvojvrstvy buněčných membrán, což způsobí buněčnou smrt. To značí, že se naskýtá možnost vývoje a případně výroby nových antimikrobiálních léčiv i proti druhům bakterií, které odolávají některým lékům, např. methicilinu. Methicilin se používal jako antibiotikum proti grampozitivním (G^+) bakteriím rodu *Staphylococcus* nebo *Streptococcus* (např. *Staphylococcus aureus*), ale dnes je známo, že většina těchto bakterií účinkům methicilinu odolává (např. methicillin-rezistentní *Staphylococcus aureus*, MRSA) (Choi et al., 2015; Wehbe et al., 2019; Sameh et al., 2023).

2.1.1.2 Propolis

Jak bylo zmíněno, krom jedu se při apiterapii k léčbě řady onemocnění používají i jiné včelí produkty - například propolis, tedy včelí tmel. Jedná se o látku z rostlinné pryskyřice, kterou včely smísí s voskem, aby utvořily poddajnou hmotu. Včelami je využíván při stavbě a opravách úlu. Rovněž slouží jako ochrana před deštěm, chladem a predátory. Díky svým antimikrobiálním vlastnostem také včely chrání před napadením patogeny. Složení propolisu se liší podle rostliny, z níž byl vytvořen. Mezi látky obsažené v propolisu patří polyfenoly, kyselina benzoová a její deriváty, kyselina skořicová a její deriváty, kyselina kávová, terpeny, deriváty benzaldehydu, steroly, aldehydy, alkoholy a aminokyseliny. Různé složení propolisu vypovídá o jeho různých biologických účincích (Ahuja & Ahuja, 2011).

Propolis se v posledních letech často využívá jako přípravek v dentální medicíně při léčbě aftů, kvasinkových infekcí a zánětu dásní. O účincích propolisu věděli již lidé ve starověkém Egyptě, kde byl propolis spolu s medem a dalšími pryskyřicemi využíván pro mumifikaci mrtvých. Kromě mumifikace byl však propolis užíván v různých formách jako způsob léčby či prevence řady nemocí (Ahuja & Ahuja, 2011). Využitím propolisu se zabývá například výzkum v Litvě více než padesát let. Dnes je propolis dostupný v podobě např. tablet, mastí a ústních sprejů, které jsou prodávány jako doplňky stravy ve většině litevských lékáren. Tyto produkty jsou mezi tamějšími zákazníky velmi populární. Jejich primární využití je prevence nemocí, ale je možnost je využít i jako léčebný produkt. V roce 2018 byl proveden výzkum účinků propolisu při palmoplantární psoriáze (lupénka lokalizovaná na dlaních a chodidlech), kdy byla použita mast Aloreed

z propolisu (50 %) a aloe vera (3 %). Výsledky prokázaly zlepšení stavu u 86 % případů, díky čemuž se usuzuje, že je léčba mastí Aloreed z propolisu a aloe vera vhodná při palmoplantární psoriáze (Trumbeckaite et al., 2015; El-Gammal et al., 2018).

Propolis je zkoumán pro své protizánětlivé účinky, které jsou dány přítomností biologicky aktivních flavonoidů a derivátů kyseliny skořicové (Mašek et al., 2018). Jedním z těchto derivátů je fenethylester kyseliny kávové. Je prokázáno, že inhibuje syntézu interleukinu 2 ve stimulovaných T-lymfocytech (Márquez et al., 2004). Další protizánětlivé účinky jsou způsobeny inhibicí hyaluronidasy (Ahuja & Ahuja, 2011).

Další zkoumanou vlastností propolisu jsou jeho antimikrobiální účinky. Je prokázáno, že propolis působí antimikrobiálně na G^+ bakterie a kvasinky, avšak tento účinek je menší u gramnegativních (G^-) bakterií (Ahuja & Ahuja, 2011). Antimikrobiální účinky jsou dány obsahem kyseliny fenolkarboxylové a již zmíněných flavonoidů. Pro dentální medicínu je nejdůležitější antimikrobiální aktivita proti *Streptococcus mutans*; bakterii, která je hlavní příčinou zubních kazů (Koo et al., 2002). Léčebné účinky propolisu jsou však kvůli jeho různému složení do jisté míry variabilní.

2.1.1.3 Med

Dalším produktem, který je hojně využíván v apiterapii, je med, tedy viskózní zlatavá tekutina sladké chuti o pH 3,2 - 4,5 (Albaridi, 2019). Podobně jako u propolisu se chemické složení medu liší podle oblasti, odkud pochází, a rostliny, z níž je tvořen. Dnes existuje asi 320 druhů medu. Mezi látky, které byly v medu identifikovány, patří cukry (cca 90–95 %), voda, organické kyseliny (např. kyselina kávová) a minerály. K biologicky aktivním látkám v medu se řadí vitamíny (např. riboflavin), kyselina skořicová, kyselina pantothenová, flavonoidy a aminokyseliny. Med vykazuje antimikrobiální, antioxidační a protizánětlivé vlastnosti, což je mimo jiné přisuzováno obsahu fenyلكarboxylových kyselin (skořicová a kávová) a flavonoidů (Dumitru et al., 2022).

O jeho léčebných účincích se ví již od dob starověkého Řecka. Hippokrates (460-367 př.n.l.) tvrdil, že „med léčí vředy, puchýře a karbunkly“ (Ahuja & Ahuja, 2010). Tento fakt je dnes přisuzován hlavně antibakteriálním účinkům medu, o kterých se poprvé zmínil holandský vědec Van Ketel v roce 1892 (Molan, 2015). Tyto účinky jsou ovšem různé. Ne všechny druhy medu prokazují stejnou úroveň antibakteriální aktivity, což je přisuzováno různému složení. Antimikrobiální aktivita medu je tedy určena několika faktory, mezi které patří kyselé pH inhibující růst mnoha patogenů, jejichž růst

je možný při hodnotách pH 7,2-7,4 (Ahuja & Ahuja, 2010); obsah peroxidu vodíku, který je tvořen enzymem glukosaoxidase (beta-D-glukosa:kyslíkoxidoreduktasa, EC 1.1.3.4) (Dumitru et al., 2022) a rostlinný původ medu, a tedy obsah flavonoidů (Vorlová et al., 2011; Bucekova et al., 2019; Dumitru et al., 2022). Vysoký obsah cukru v medu inhibuje růst mikroorganismů díky vysokému osmotickému tlaku (Dumitru et al., 2022).

Přírodní med je používán jako prostředek k léčbě špatně se hojících ran nereagujících na konvenční antibiotika (např. bércové vředy, dekubity) či jiných ran, u kterých se vyskytují komplikace při hojení (Majtan, 2009). Med Manuka z rostlin rodu *Leptospermum* (*Leptospermum scoparium*, *Leptospermum polygalifolium* atd.) je znám díky obsahu methylglyoxalu. Tomu je přisuzována vysoká antimikrobiální aktivita medu Manuka nezpůsobená peroxidem vodíku (Willix et al., 1992; Albaridi, 2019).

Mimo antimikrobiální aktivitu med zajišťuje zvlhčování rány a tvoří bariéru, která brání průchodu mikroorganismů do zasaženého místa (Dumitru et al., 2022). Bohužel bývá med často kontaminován kvasinkami (*Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*) a plísněmi (*Penicillium*, či *Mucor*), což komplikuje jeho použití v terapii (Ahuja & Ahuja, 2010).

Kromě antimikrobiálních účinků má med i protizánětlivé účinky. Inhibuje totiž enzymy, které se podílejí na rozvoji zánětlivé reakce (cyklooxygenasa-1 a cyklooxygenasa-2). Podobně jako antimikrobiální účinky i protizánětlivé účinky úzce souvisí se složením medu a jejich efekt je různý (Dumitru et al., 2022).

2.1.1.3 Mateří kašička

Mateří kašička (MK) primárně slouží jako krmivo jak pro larvy včel, tak pro včelí matku. Jedná se o bíložlutou kyselou tekutinu, která má konzistenci želatiny. Je produkována hltanovými žlázami mladých včelích dělnic. Dnes se za největšího producenta a exportéra MK považuje Čína, která je zodpovědná za více než 60 % celosvětové produkce MK (Sabatini, 2009; Collazo et al., 2021). Staří Řekové tvrdili, že je MK součástí ambrosie, tedy nektaru, který dával tamějším bohům jejich nesmrtelnost (Fratini et al., 2016).

MK je kyselý roztok (pH 3,5 - 4,5), jehož majoritní složkou je voda. Dále obsahuje peptidy, proteiny, sacharidy, lipidy, minerály, vitamíny, fenoly a aminokyseliny (Collazo et al., 2021). Složení ale závisí na lokaci a době produkce, takže je velmi variabilní, jak je tomu u jiných včelích produktů (Collazo et al., 2021). Za řadu fyziologických vlastností vděčí MK hlavně proteinům označovaným jako MRJP 1-9 (z angl. „major royal jelly proteins“), které slouží jako zásobárna dusíku. Dále mají důležitou roli při výživě matky

a vykazují antioxidační vlastnosti (Fratini et al., 2016; Collazo et al., 2021). Pro včelu jsou rovněž důležité antimikrobiální peptidy mateří kašičky royalisin a jelleiny, které jí zajišťují obranu proti mikrobům. Dalším proteinem, který je velmi významný pro vývoj matky, je royalactin (MRJP 1), který indukuje vývoj larvy v matku (Kamakura, 2011; Collazo et al., 2021). Podobně jako v medu se zde nachází enzym glukosaoxidas, která produkuje peroxid vodíku. Jeho přítomnost opět vede k antimikrobiálním účinkům MK (Fratini et al., 2016).

Mezi látky neproteinové povahy v MK, které však jsou biologicky aktivní, patří lipidy. Jedná se hlavně o volné mastné kyseliny, vosky, steroidy a fenoly (Collazo et al., 2021). Jednou z nejtypičtějších sloučenin lipidového charakteru je tzv. „queen bee acid“, tedy kyselina včelí matky (10-hydroxy-2-decenová kyselina, angl. „10-hydroxy-2-decenoic acid“, 10-HDA). Tato látka má mnoho biologicky aktivních účinků, například působí antibakteriálně narušením integrity membrány bakterie a brání růstu spor a vegetativních buněk (Šedivá et al., 2018; Yang et al., 2014; Collazo et al., 2021). Kyselina 10-HDA byla zkoumána v souvislosti s obnovou kožní bariéry. Během studie od Duplan et al., 2011 byla použita uměle připravená 10-HDA, Hydroxydecine®, a byla prokázána obnova kožní bariéry, stejně tak jako snížení zarudnutí a otoku a hydratace suché pokožky (Duplan et al., 2011; Collazo et al., 2021). Pro člověka má MK využití hlavně ve farmaceutickém a kosmetickém průmyslu, kde se z ní vyrábí doplňky stravy a masti. Vzhledem k obsahu vitaminů – konkrétně kyseliny pantothenové, o níž se ví, že mimo jiné posiluje vlasová vlákna a podporuje jejich regeneraci – se MK používá do produktů pečujících o vlasy. Pro kosmetický průmysl je tato látka zajímavá hlavně kvůli svému anti-aging (protistárnoucímu) efektu. Už ve starověkém Egyptě byla mateří kašička pro své příznivé účinky na pleť notoricky známá, a to hlavně díky královně Kleopatře. I dnes jsou z mateří kašičky mimo jiné vyráběny krémy, séra a esence právě s anti-aging efektem (Collazo et al., 2021; Fratini et al., 2016).

Výzkum zabývající se zdravotními benefity MK ukazuje, že pravidelná konzumace MK zmírňuje příznaky menopauzy a premenstruačního syndromu (Taavoni et al., 2014; Sharif & Darsareh, 2019). Studie také potvrzují neuroprotektivní účinky MK, což by v budoucnu mohlo vést k vývoji nových terapií neurodegenerativních onemocnění (Parkinsonova choroba a Alzheimerova choroba). Tyto účinky, podobně jako hepatoprotektivní účinky při nealkoholovém poškození jater při steatóze (angl. „Non-alcohol fatty liver disease“), jsou pravděpodobně dány antioxidačními vlastnostmi MK (Collazo et al., 2021). Pro využití těchto účinků při terapii je ale potřeba další výzkum.

2.1.1.4 Další produkty využívané v apiterapii

Mezi další včelí produkty, které se – přestože ne tak často – využívají v apiterapii patří včelí pyl a včelí vosk. Včelí pyl je v apiterapii využitelný jen jako perga, tedy včelí chléb, což je pyl, který byl včelami zpracován. Perga se tvoří fermentací a užívá se jako potravinový doplněk. Včelí vosk je včelami produkován ve formě šupinek, které jsou potom dále zpracovány. Lidmi je využíván jako součást krémů a mastí, případně jsou z něj vyráběny ušní a tělové svíce. Jak již ale bylo zmíněno, perga a včelí vosk nemají pro apiterapii velmi rozsáhlé využití (Ćirić et al., 2022; Weis et al., 2022)

2.1.2 Využití apiterapie

Včelí jed, propolis, med i mateří kašička jsou pro včely nepostradatelnými složkami, které udržují chod včelí společnosti. Ať už se jedná o zdroj energie, způsob obrany nebo stavební materiál, daná látka má své uplatnění. Lidmi jsou včelí produkty zkoumány především pro svou biologickou aktivitu, což jim dává potenciál být využity při léčbě různých onemocnění. Nespornou výhodou apiterapie je její dostupnost. Včelí produkty jsou v mnoha zemích mnohonásobně dostupnější než léčiva využívaná klasickou západní medicínou (Weis et al., 2022).

Nevýhodou využití včelích produktů v léčebných aplikacích jsou alergické reakce, které mohou po požití či aplikaci některých včelích produktů nastat. Pro jejich aplikaci je tedy nezbytné testování, zdali je člověk na daný produkt alergický. Při užívání malých dávek, které budou postupně zvětšovány, se však dá vybudovat vůči látce odolnost. Na tomto principu je založen mithridatismus, jehož základem je vybudování rezistence k jedům díky vystavování organismu postupně se zvyšujícím množství škodlivé látky, přičemž dochází ke změnám v metabolismu. Dnes se v medicíně využívá specifická imunoterapie v léčbě alergických stavů, kde je lidský organismus rovněž vystavován alergenům, čímž pak dochází ke snížení reaktivity organismu na daný alergen (Hellner et al., 2008; Tsatsakis et al., 2018).

V posledních letech našla apiterapie uplatnění při léčbě koronavirového onemocnění 2019 (coronavirus disease 2019, COVID-19). V Brazílii, konkrétně ve státě Santa Catarina, bylo během nouzového stavu zdravotníkům doporučeno aplikovat metody CAM, mezi nimiž byla i apiterapie v podobě použití propolisové tinktury (Weis et al., 2022).

Stanovení jednotných účinků včelích produktů není jednoduché vzhledem k variabilitě jejich složek. Složení produktů se mění v závislosti na lokaci, kde se včela nachází,

na rostlině, z níž je produkt vyroben, a někdy i na ročním období. Právě složení pak ovlivňuje účinek. Určitým řešením je porovnávat vzorky z daného regionu, což by pak mohlo vést k uspokojivé odpovědi na otázku, jaký efekt se dá u daného vzorku z daného místa očekávat (Weis et al., 2022).

Je prokázáno, že je apiterapie silně podpůrnou při klasických západních medicínských metodách. Předpokládá se, jestliže je aplikována léčba kombinací včelího produktu s klasickým léčivem (jako jsou antibiotika, protizánětlivé léky nebo chemoterapie) její účinek je minimálně stejně tak efektivní, jako použití samotného konvenčního léčiva. Postačuje však menší dávka nebo menší koncentrace konvenčního léčiva, použitého v kombinaci se včelím produktem než při aplikaci pouze léčiva samotného. Tímto by mohl být snížen počet anebo míra vedlejších účinků vyvolaných klasickými metodami (Weis et al., 2022).

2.2 Biologicky aktivní látky včelího jedu

VJ, tedy apitoxin, je pro své zajímavé vlastnosti již dlouho předmětem výzkumu. V antickém Řecku jej pro terapeutické účely používal Hippocrates, ačkoliv přesně nevěděl, jak tato látka působí (Bogdanov, 2016). O jeho účincích, mezi které patří mimo jiné obvyklé otoky a bolest, není pochyb. VJ dokonce u některých jedinců vyvolává alergickou reakci, která bez včasného zásahu mnohdy vede k anafylaktickému šoku, někdy až k smrti. Zároveň je obecně známo, že mají včelaři právě díky včelímu jedu, jemuž jsou zpravidla často vystavováni, podstatně méně potíží s klouby.

Studium včelího jedu z terapeutického hlediska využívajícího jeho bioaktivních složek započalo již v druhé polovině 19. století. Prvotní studie identifikovaly základní aktivní látky VJ a také popsaly jejich působení. Dnes se díky těmto výzkumům ví, že VJ je průhledný kyselý roztok (pH 4,5 – 5,5), který je tvořen z 88 % vodou. Sušina je velmi složitá směsice látek peptidového a proteinového charakteru, enzymů a biologicky aktivních aminů. Další látky, např. minerály, těkavé látky a aminokyseliny jsou zastoupeny v menším množství. Látek izolovaných ze VJ je veliké množství, např. v roce 2014 bylo identifikováno více než 102 různých látek pouze peptidové a proteinové povahy (Van Vaerenbergh et al., 2014; Wehbe et al., 2019; Carpena et al., 2020; Khalil et al., 2021).

Hlavní biologicky aktivní komponenty včelího jedu jsou shrnuty v tabulce 1.

Tab. 1: Přehled hlavních biologicky aktivních složek včelího jedu (*Carpena et al., 2020*).

Typ molekuly	Název	Hlavní účinky
Peptidy	Melittin	cytotoxicita, protizánětlivé účinky, aktivace bvPLA2
	Apamin	blokace draselných kanálů
	MCD peptid*	ovlivnění zánětlivých reakcí závislých na žírných buňkách
	Adolapin	inhibice zánětlivých účinků
	Secapin	zabránění krvácení, ve vysokých dávkách analgetikum
	Vitellogenin	cytotoxicita, antioxidační účinky
Enzymy	bvPLA2†	cytotoxicita, indukce alergické reakce
	Hyaluronidasa	šíření komponent do tkání, indukce alergické reakce
Biologicky aktivní aminy	Histamin	rozvoj zánětu, šíření komponent jedu
	Serotonin	rozvoj zánětu, šíření komponent jedu
	Dopamin	zrychlení srdeční aktivity, šíření komponent jedu
	Adrenalin	zrychlení srdeční aktivity, šíření komponent jedu
	Norepinefrin	zrychlení srdeční aktivity, šíření komponent jedu

*MCD peptid - peptid degranulující žírné buňky (angl. mast cell degranulating peptide)

†bvPLA2 - fosfolipasa A2 ze včelího jedu (angl. bee venom phospholipase A2)

2.2.1 Melittin

Melittin je majoritní složkou včelího jedu tvořící 40-60 % obsahu sušiny (Chen et al., 2016). Jedná se o bazický peptid tvořený α -helixem. Jeho primární struktura je dána dvaceti šesti aminokyselinovými zbytky (Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln). Jedná se amfipatický peptid; jeho C-konec je hydrofilní a N-konec je hydrofobní. Tato vlastnost melittinu zodpovídá za jeho rozpustnost ve vodě a schopnost narušit fosfolipidové dvojvrstvy biomembrán (Habermann & Jentsch, 1967; Wehbe et al., 2019).

Melittin je schopen v závislosti na několika faktorech - např. jeho vysoká koncentrace anebo přídavek soli ke vzorku - schopen tvořit tetramerní struktury, které jsou složeny ze čtyř monomerních molekul melittinu. Také vysoké pH vede k tvorbě tetramerních komplexů (Bello et al., 1982). Melittin má kladný náboj (+6), ale ve vyšších hodnotách pH o něj přichází. Tím se snižuje elektrostatický odpor, což umožní zaujetí tetramerní struktury v alkalickém pH (Raghuraman & Chattopadhyay, 2007).

2.2.1.1 Interakce melittinu s fosfolipidovou dvojvrstvou

Amfipatický charakter melittinu umožňuje jeho interkaci s fosfolipidovou dvojvrstvou, přičemž se jeho hydrofilním C-koncem váže na fosfátovou složku biologických membrán. Následně je do membrány vnořena hydrofobní část melittinu, čímž je integrita lipidové dvojvrstvy narušena (Carpena et al., 2020). Melittin si v membráně převážně

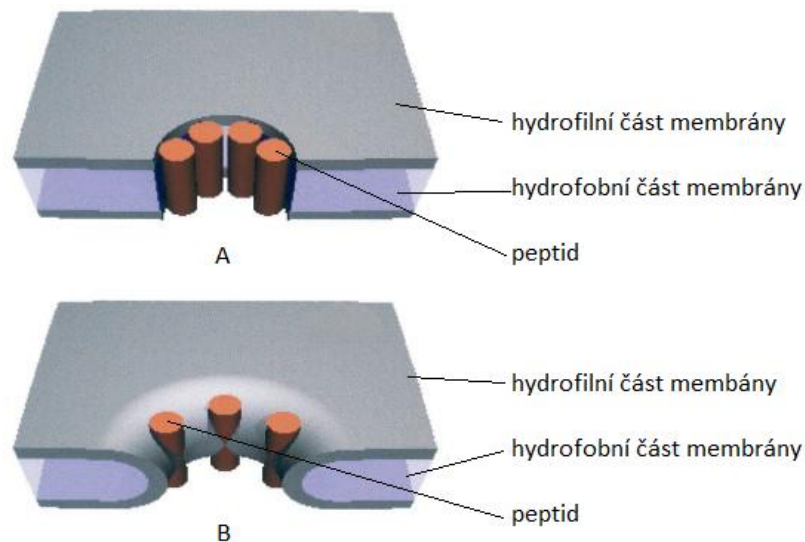
zachovává svou strukturu α -helixu, jen jeho krátká část na C-konci tuto konformaci ztrácí (Raghuraman & Chattopadhyay, 2007).

Monomerní melittin se na membrány často váže paralelně. Navázání melittinu v této podobě je však z pohledu narušení integrity membrány inaktivní a k vytvoření póru nevede, dokonce brání navázání dalších molekul melittinu. Aby došlo k narušení membrány, musí být melittin k membráně navázán kolmo. Ke zvýšení podílu molekul melittinu, které jsou na membránu navázány kolmo, přispívá zvýšení jeho koncentrace, ovšem změna orientace vazby po jejím uskutečnění je nemožná (van den Bogaart et al., 2008). Obecně platí, že k narušení membrány za vzniku póru, jsou potřeba minimálně čtyři monomerní jednotky melittinu (Tosteson & Tosteson, 1981; Hristova et al., 2001).

Kromě množství melittinu je tvorba póru ovlivněna i dalšími faktory, jako je třeba poměr množství melittinu a množství lipidů, složení membrány, teplota, pH a iontová síla (Raghuraman & Chattopadhyay, 2007). Velikost vznikajícího póru je rovněž závislá na několika faktorech, přičemž nejdůležitějším z nich je koncentrace peptidu (Ladokhin et al., 1997; Yang et al., 2001). Velikost vzniklého póru pak udává, zda je pór propustný pouze pro ionty či i větší molekuly. Když je v membráně vytvořeno větší množství pórů, obsah buňky se vyleje ven a buňka umírá (Tosteson & Tosteson, 1981; Wehbe et al., 2019; Carpena et al., 2020).

Mechanismus tvorby pórů v membráně účinkem melittinu neodpovídá modelu sudové skruže (tzv. „barrel-stave model“), ale spíše modelu toroidnímu. U vzniku tohoto typu modelu je peptid spojen s fosfolipidovou složkou membrány, konkrétně s hydrofilními konci fosfolipidů, pór vzniká postupným prohýbáním jedné vrstvy membrány, takže je ohraničen jak peptidy, tak hydrofilními částmi membrány (Obr. 1) (Yang et al., 2001).

Během studia interakce melittinu s fosfolipidovou membránou je důležité pracovat s čistým melittinem, jelikož surový VJ obsahuje i další aktivní složky, včetně bvPLA2. Tento enzym je schopen rovněž štěpit fosfolipidovou dvojvrstvu. Jeho aktivita je navíc zvýšena přítomností melittinu, který po navázání na membránu poskytne kladný náboj, čímž navýší afinitu vazby PLA2 k membráně (Dempsey, 1990; Grandbois et al., 1996). Enzymová aktivita PLA2 ze včelího jedu je však závislá na přítomnosti vápenatých iontů Ca^{2+} . Za nízkých hladin vápenatých iontů ve vzorku je účinek PLA2 zanedbatelný (Gennis, 1989; Yang et al., 2001). Mechanismus tvorby pórů melittinem je zobrazen na Obr. 1.



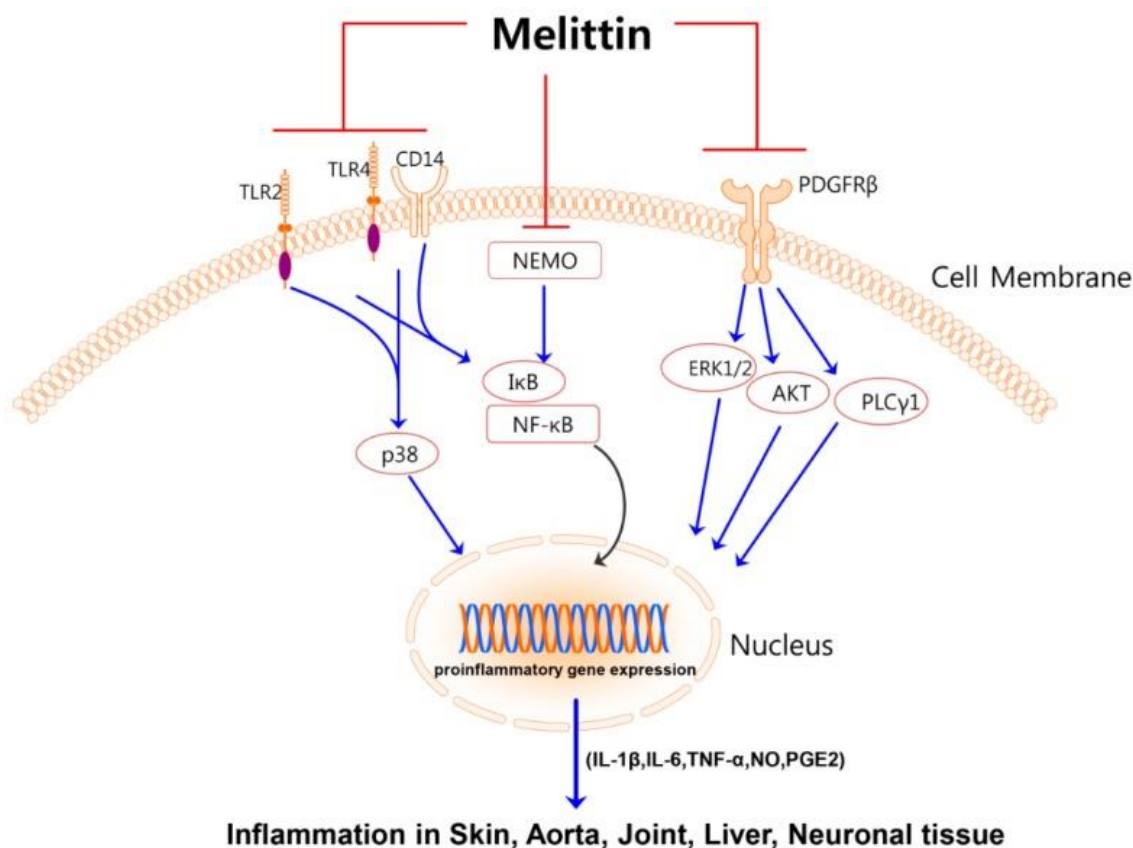
Obr. 1: Porovnání modelů tvorby pórů v biologických membránách, převzato od Yang et al., 2001. A) model sudové skruže („barrel-stave model“), kde je pór tvořen přímo molekulami peptidu, B) model toroidního póru, kde dochází k ohybu a zúžení membrány vlivem melittinu.

2.2.1.2 Protizánětlivé účinky

Zánět je odpovědí imunitního systému organismů na přítomnost patogenů nebo jiných škodlivých podnětů. Při poškození tkáně dochází jako první k lokálnímu zánětu, který se projevuje otoky, zarudnutím a zvýšenou teplotou v místě poškození vlivem vazodilatace cév. Vazodilatace má za úkol přesunout co největší množství buněk imunitního systému v krvi do místa poškození. Při zánětu dochází k uvolnění prozánětlivých látek, jako např. cytokiny nebo histamin, které se také podílí na migraci buněk imunitního systému. Pokud se imunitní systém s podnětem není schopen dlouhodobě vypořádat, zánět se stává chronickým a může vést až k rozvoji mnoha nemocí, mezi něž patří revmatoidní artritida, diabetes, astma nebo nemoci spojené s centrálním nervovým systémem (CNS), jako třeba Parkinsonova choroba nebo Alzheimerova choroba (Glass et al., 2010).

Je obecně známo, že melittin ve vysokých dávkách zánětlivé reakce vyvolává, avšak pokud je podáván v dávkách menších, jeho účinky jsou protizánětlivé, přičemž mohou být vyvolány několika způsoby. Melittin je schopen blokovat Toll-like receptory (TLR) 2 a 4, proteiny z rodiny diferenciačního klastru 14 (angl. „cluster of differentiation 14 proteins“, CD14) a receptor beta růstového faktoru krevních destiček (angl. „platelet-derived growth factor receptor beta“, PDGFR β). Zároveň je schopen inhibovat esenciální modulátor faktoru NF- κ B (tzv. NEMO), který mimo jiné ovlivňuje expresi genů důležitých pro imunitní odpověď včetně zánětu. Tím jsou blokovány dráhy, kterých jsou tyto proteiny součástí, čímž je znemožněno uvolnění cytokinů, tumor nekrotizujících

faktorů (TNF) nebo prostaglandinu E2 (PGE2), které způsobují právě zánětlivou reakci (Lee & Bae, 2016; Carpena et al., 2020). Mechanismus protizánětlivých účinků melittinu je zobrazen na Obr. 2.



Obr. 2: Hlavní mechanismy protizánětlivých účinků melittinu, převzato z (Lee & Bae, 2016). Melittin blokuje signální dráhy TLR2, TLR4, CD14, NEMO a PDGFRβ. Tím snižuje míru aktivace mitogen aktivované protein kinasy (MAP) p38, extracelulárním signálem regulovatelných kinas (ERK1/2), protein kinasy B (PKB, také AKT) a fosfolipasy C, gama 1 (PLCγ1). Také brání přesunu NF-κB do jádra, čímž zamezí expresi genů vyvolávajících zánětlivou reakci. Zkratky: TLR2 a 4 - Toll like receptor 2 a 4, CD14 – diferenciativní skupina 14, NEMO – esenciální modulátor nukleárního faktoru kappa-B, PDGFRβ – receptor beta růstového faktoru krevních destiček

2.2.1.3 Antivirové účinky melittinu

Další sledovanou vlastností melittinu jsou jeho antivirové účinky. V roce 2020 byla publikována studie shrnující poznatky z *in vitro* a *in vivo* studií antivirových účinků melittinu (Memariani et al., 2020). Bylo potvrzeno, že hlavní protivirová aktivita melittinu spočívá v interakci s obalem viru nebo proteiny virového kapsidu, což ovlivní interakci viru s hostitelskou buňkou. Na základě tohoto faktu byl zkoumán účinek melittinu na virus lidské imunitní nedostatečnosti (z angl. „human immunodeficiency virus 1“, HIV-1), který způsobuje syndrom získaného selhání imunity (z angl. „acquired immunodeficiency syndrome“, AIDS). Po daný experiment byl testován účinek melittinu jak volného, tak vázaného na nanočástice, které fungovaly jako jeho nosiče. V obou případech bylo potvrzeno snížení infekčnosti viru (Hood et al., 2013). Dalším možným mechanismem antivirového účinku je inhibice replikace virové nukleové kyseliny stimulací interferonu I (I-IFN), který je kromě inhibice virové replikace zodpovědný např. za stimulaci aktivity buněk tzv. „přirozených zabijáků“ (z angl. „natural killers cells“, NK cells) nebo navýšení prezentace fragmentů antigenu T lymfocytům. Inhibicí replikace virové nukleové kyseliny se zamezí množení viru a vzniku dalších virových částic. Dále bylo zjištěno, že melittin inhibuje expresi mRNA neobalených RNA virů v hostitelských buňkách, jako je například Enterovirus-71 (Uddin et al., 2016).

2.2.2 Apamin

Dalším biologicky aktivním peptidem je apamin tvořený z osmnácti aminokyselin. Obsahuje dva disulfidové můstky, které spojují Cys v pozicích 1-11 a 3-15. Sekvence aminokyselin apaminu je Cys¹-Asn-Cys³-Lys-Ala-Pro-Glu-Thr-Ala-Leu-Cys¹¹-Ala-Arg-Arg-Cys¹⁵-Gln-Gln-His. Sekundární struktura obsahuje β -smyčku a krátký α -helix (Kuzmenkov et al., 2022). Apamin je schopen projít přes hematoencefalickou bariéru a tím ovlivňovat neurony v CNS a nervosvalovou ploténku. Působí jako neurotoxin, který vyvolává nekontrolovatelné pohyby svalů až křeče (Habermann, 1972; Wehbe et al., 2019). Jeho neurotoxický účinek je důsledkem blokace Ca²⁺-dependentních draselných kanálů, jelikož působí jako jejich alosterický inhibitor (Lamy et al., 2010; Carpena et al., 2020). Mimo to se apamin váže na muskarinový acetylcholinový receptor M2 na postsynaptické části nervosvalové ploténky motorických nervů, který tak aktivuje, čímž dochází k redukci nervosvalového přenosu. Díky tomu má apamin potenciální využití při léčbě různých nemocí CNS, jako např. Alzheimerova choroba nebo Parkinsonova choroba (Silva et al., 2010).

2.2.3 Peptid degranulující žírné buňky

Peptid degranulující žírné buňky, z angl. „mast cell degranulating peptide“ (MCDP, MCD peptid), též znám jako peptid 401, je peptid složený z dvaadvaceti aminokyselin. Strukturně se podobá apaminu; také obsahuje dva disulfidové můstky, konkrétně mezi Cys v pozicích 3-15 a 5-19. Primární struktura MCD peptidu je dána sekvencí Met-Cys-Ile-Cys-Lys-Asn-Gly-Lys-Pro-Leu-Pro-Gly-Phe-Ile-Gly-Lys-Ile-Cys-Arg-Lys-Ile-Cys-Met-Met-Gln-Gln-Thr-His. Za fyziologického pH má kladný náboj (Wehbe et al., 2019; Carpena et al., 2020).

Při nízké koncentraci MCD peptid způsobuje degranulaci žírných buněk. MCDP zvyšuje hladinu volných Ca^{2+} iontů v cytoplazmě, což vede k následnému uvolnění histaminu ze žírných buněk do krve (Elieh Ali Komi et al., 2017). To následně vyvolává odpověď imunitního systému, jejímž důsledkem je zarudnutí, bolest až propuknutí zánětu. MCD peptid aktivuje imunitní odpověď i jeho vazbou na IgE, chová se tedy jako alergen. Je schopen propojit dvě molekuly IgE pomocí regionů, kde se váže antigen (fragmentová oblast vázající antigen, z angl. „fragment antigen binding“, Fab), což aktivuje receptor pro IgE a to následně způsobí degranulaci žírných buněk a také uvolnění histaminu (Birr & Wengert-Müller, 1980).

Vzhledem k podobnosti vazebného místa IgE s některými částmi MCDP je MCD peptid v nepřítomnosti IgE také schopen navázat se na receptory pro IgE a nahradit je při vyvolání alergické reakce. To je dáno výskytem shluků bazických aminokyselin, které jsou podobné vazebnému místu na receptoru pro IgE molekuly (Buku, 1999; Stanworth et al., 1979).

Na druhou stranu je MCDP při vyšších koncentracích schopen degranulaci žírných buněk inhibovat (Hanson et al., 1974; Carpena et al., 2020). Vysoká afinita MCDP k receptorům pro IgE vede k navázání MCDP, čímž je receptor blokován pro navázání IgE. Tím je zabráněno degranulaci. Dále může MCDP s IgE protilátkami tvořit komplex pomocí disulfidických můstků. Tato konformační změna opět znemožní navázání protilátky na receptor, čímž je zabráněno dalšímu přenosu signálu (Buku & Price, 2001; Carpena et al., 2020).

Kromě ovlivnění zánětlivých reakcí může MCDP působit jako neurotoxin, podobně jako apamin. Dokáže blokovat Ca^{2+} - dependentní draselné kanály, což vede k zesílení nervových vzruchů (Mourre et al., 1997; Carpena et al., 2020).

2.2.4 Adolapin

Adolapin je bazický polypeptid, který je složen ze 103 aminokyselin (Shkenderov & Koburova, 1982). Adolapin inhibuje aktivitu cyklooxygenasy a lipoxygenasy, čímž eliminuje reakce vedoucí ke vzniku bolestí a zánětu. Inhibicí těchto enzymů totiž dochází k blokadě přeměny kyseliny arachidonové na prostaglandiny, které se významně účastní zánětlivých procesů. Adolapin zároveň působí jako antipyretikum, tedy vede ke snižování teploty při horečce. Také bylo potvrzeno, že inhibuje aktivitu PLA2 ze včelího jedu (Shkenderov & Koburova, 1982; Jung et al., 2015; Wehbe et al., 2019).

2.2.5 Secapin

Secapin je peptid, který je složen z 25 aminokyselin. Strukturně se podobá MCD peptidu a apaminu; rovněž ve své struktuře obsahuje disulfidový můstek, a to mezi aminokyselinami Cys v pozicích 9-20. Největší množství secapinu se vyskytuje v jedu včelích matek (Carpena et al., 2020).

Mezi studované jedy, v nichž se secapin vyskytuje, patří kromě jedu včely medonosné jed včely medonosné kraňské (*Apis mellifera carnica*) a včely východní (*Apis cerana*). Secapin jedu včely medonosné při podání myším ve vyšších dávkách působí jako sedativum a vyvolává pokles tělesné teploty spolu se zježením srsti (Gauldie et al., 1976). Uvádí se, že působí jako neurotoxin (Taylor et al., 1984). Při studiích jedu *Apis mellifera carnica* bylo potvrzeno, že do jisté míry působí antimikrobiálně. Je důležité zmínit, že jed *Apis mellifera carnica* je fylogeneticky bližší čeledi *Vespidae*, a proto nemusí být zmíněné účinky pozorovány u jiných včelovitých (Hou et al., 2014).

Se secapinem z jedu *Apis cerana* pracovali Lee et al., 2016, kteří potvrdili antimikrobiální aktivitu jedu *Apis cerana*. Rovněž potvrdili, že tento secapin funguje jako inhibitor serinových proteas (např. plasminu) čímž zamezuje rozpouštění fibrinu a zabraňuje tak krvácení (Lee et al., 2016).

2.2.6 Vitellogenin

Vitellogenin je fosfoglykoprotein; prekurzor žlutkového proteinu vejcorodých organismů, tedy potrava pro vyvíjející se plod. U hmyzu prochází posttranslačními modifikacemi (např. glykosylací a fosforylací), než je sekretován do hemolymfy a přesunut do oocytů (Tufail & Takeda, 2008). Kromě reprodukce organismů se například účastní i imunitních procesů (např. transportuje fragmentovaný antigen do vajíčka, čímž stimuluje imunitní systém ještě před vylíhnutím plodu) a ochrany před oxidačním

stresem, který je způsoben reaktivními formami kyslíku (Park et al., 2018). Vitellogenin je vysokomolekulární složka včelího jedu složená z 1770 aminokyselin. Obvykle je spojován s mateří kašičkou, která larvám včel a matkám zajišťuje výživu. Vitellogenin díky antioxidačním účinkům ovlivňuje délku života včely. Bylo však zjištěno, že vitellogenin ze včelího jedu je schopen reagovat s IgE protilátkami, takže je označován jako alergen Api m 12 (Blank et al., 2013). Jeho funkce ve včelím jedu však zatím není známa.

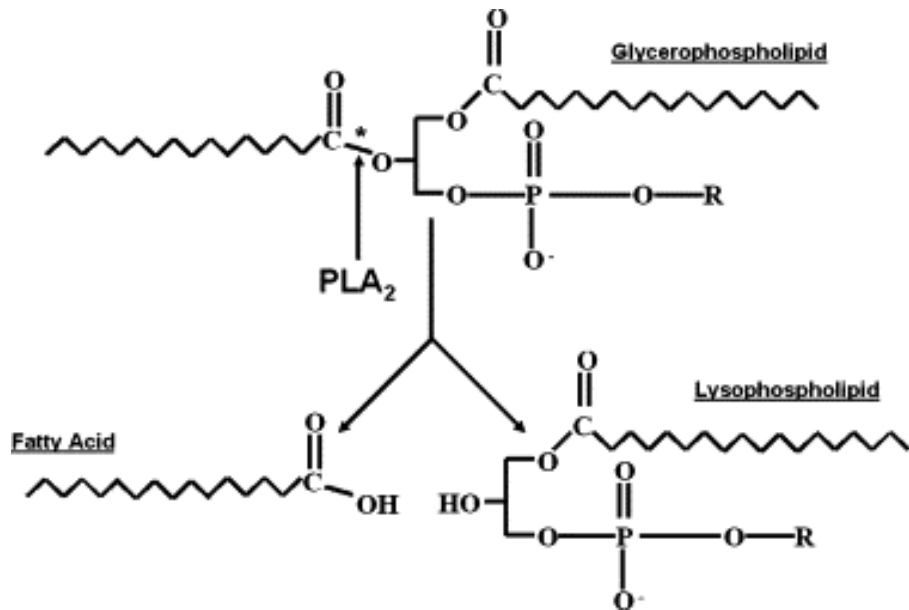
2.2.7 Fosfolipasa A2

Jedním z významných biologicky aktivních enzymů včelího jedu je bvPLA2. Je to jeden z hlavních alergenů včelího jedu a je označován jako Api m 1 (Burzyńska & Piasecka-Kwiatkowska, 2021). Fosfolipasy se řadí mezi hydrolasy a mají důležitou roli při metabolismu lipidů. Konkrétněji fosfolipasy A2 jsou schopné rozštěpit esterovou vazbu mezi druhým (prostředním) uhlíkem glycerolu a mastnou kyselinou ve fosfolipidech.

PLA2 ze včelího jedu je polypeptid složený ze 134 aminokyselin, který obsahuje pět disulfidových můstků mezi Cys v pozicích 9-31, 30-70, 37-63, 61-95 a 105-113. Tyto disulfidové můstky zodpovídají za stabilitu proteinu (Welker et al., 2011). PLA2 včelího jedu patří k sekretovaným fosfolipasám, kam se řadí většina fosfolipas ze živočišných jedů. Tyto enzymy jsou aktivní pouze v přítomnosti Ca^{2+} iontů. Oblast pro vazbu Ca^{2+} iontů, stejně tak jako katalytické místo, je zřejmě konzervovaná ve většině zkoumaných fosfolipas (Dennis et al., 2011).

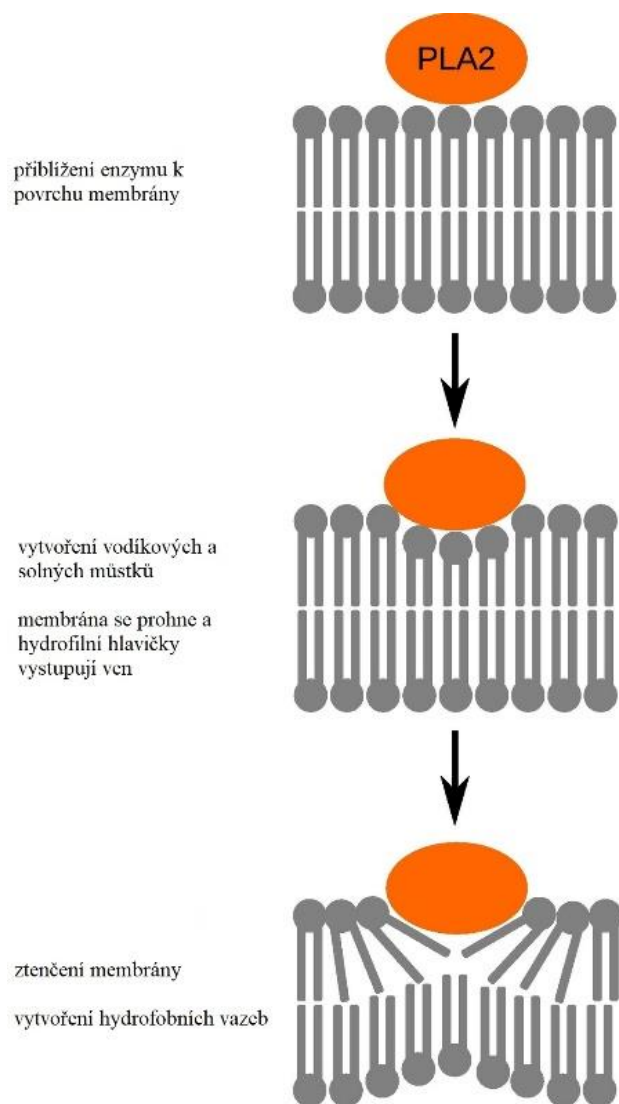
2.2.7.1 Interakce bvPLA2 s fosfolipidovou membránou

Jak již bylo zmíněno, bvPLA2 je - podobně jako jiné fosfolipasy - schopna hydrolyzovat esterovou vazbu mezi glycerolem a mastnou kyselinou (Obr. 3).



Obr. 3: PLA₂ hydrolyzuje esterovou vazbu mezi glycerolem a mastnou kyselinou ve fosfolipidech na pozici 2, při čemž dochází k uvolnění mastné kyseliny a např. lysofosfolipidu. Převzato z (Cummings, 2007)

Podmínkou pro enzymovou aktivitu bvPLA₂ je přítomnost vápenatých iontů, které napomáhají vazbě enzymu k fosfolipidové membráně. Povrch buněčných membrán je tvořen polárními fosfátovými skupinami, přičemž místo pro hydrolytické štěpení fosfolipidu bvPLA₂ je ukryto v hydrofobní části membrány, kam enzym nemá přístup. Avšak po navázání enzymu na povrch membrány je vytvořena síť vodíkových a solných můstků, které polární část přitáhnou k enzymu. Za předpokladu, že jsou vodíkové a solné můstky silnější než hydrofobní interakce mezi acylovými zbytky lipidů, jsou hydrofilní části membrány vytáhnuty ven. Opačná strana membrány se prohne dovnitř, čímž vznikne prostor pro vytvoření nových hydrofobních vazeb mezi enzymem a acylovými zbytky lipidů. Díky tomu je potom místo hydrolýzy enzymu přístupné (Aleksieva et al., 2021). Mechanismus interakce bvPLA₂ s fosfolipidovou membránou je zobrazen na obrázku 4.



Obr. 4: Mechanismus působení fosfolipasy A2 ze včelího jedu na fosfolipidovou membránu, upraveno podle (Alekseeva et al., 2021).

Hydrolýza fosfolipidů v membráně, tedy její narušení, vede ke ztrátě membránového potenciálu. Membrána se stává propustnou pro Ca^{2+} ionty, jejichž následná zvýšená koncentrace v cytoplasmě narušuje funkce mitochondrií, což vede k nedostatečné produkci adenosintrifosfátu a naopak se zvyšuje množství reaktivních forem kyslíku, tedy dochází k oxidačnímu stresu. Zároveň jsou aktivovány Ca^{2+} -dependentní proteasy degradující cytoskelet. Zvýšená koncentrace vápníku také ovlivňuje další Ca^{2+} -dependentní fosfolipasy, které pak hydrolyzují fosfolipidy v intracelulárních membránách (Burzyńska & Piasecka-Kwiatkowska, 2021).

2.2.7.2 Fosfolipasa A2 jako ligand

BvPLA2 je známá především pro svou enzymovou aktivitu, je však důležité zmínit, že se rovněž dokáže chovat jako ligand pro různé receptory. Tím je schopna přenášet signály do buňky a vyvolat tak buněčnou odpověď (Carpena et al., 2020). Mezi potvrzené receptory rozpoznávající bvPLA2 patří tzv. M a N receptory. M-receptory byly nalezeny v buňkách kosterních svalů (Lambeau et al., 1990), N-receptory byly objeveny v mozku potkanů. Předpokládá se, že právě N-receptory jsou zodpovědné za neurotoxické účinky bvPLA2 (Lambeau et al., 1989; Nicolas et al., 1997).

BvPLA2 rovněž aktivuje imunitní systém, a to vyvoláním alergické reakce. Ve většině případů dochází k přecitlivělosti prvního typu (tzv. okamžitá přecitlivělost), tedy alergické reakci, která je závislá na produkci specifických IgE. Mezi běžné příznaky patří otok, svědění a zarudnutí kůže, jak je tomu u odpovědi lidského organismu na většinu hmyzích jedů (Burzyńska & Piasecka-Kwiatkowska, 2021).

2.2.8 Hyaluronidasa

Hyaluronidasa je enzym, který katalyzuje hydrolýzu kyseliny hyaluronové, která mimo jiné zajišťuje celistvost tkání. Rozkladem této látky tedy hyaluronidasa ze včelího zvyšuje permeabilitu tkání a tím zvyšuje množství krve, které nateče do zasaženého místa. Tím následně umožní snadnější prostup jiných biologicky aktivních složek VJ hlouběji do tkání napadeného organismu. Díky tomu dostala označení „faktor šíření“ (angl. spreading factor). Zároveň může podobně jako bvPLA2 vyvolat alergické reakce, a proto se označuje jako alergen Api m 2 (Burzyńska & Piasecka-Kwiatkowska, 2021; Carpena et al., 2020).

2.3 Metody izolace melittinu ze surového včelího jedu

Jak již bylo zmíněno, při izolaci melittinu ze včelího jedu pro terapeutické účely je důležité pamatovat na skutečnost, že některé další složky včelího jedu jsou silnými alergeny, které proto nesmí získaný melittin kontaminovat. Při izolaci melittinu je tedy rovněž důležité zaměřit se na jeho efektivní purifikaci, včetně dostatečného odstranění enzymů, tedy bvPLA2 a hyaluronidasy, které patří mezi hlavní alergeny včelího jedu (Teoh et al., 2017; Burzyńska & Piasecka-Kwiatkowska, 2021).

Pro efektivní a rychlou purifikaci melittinu ze surového jedu patří mezi nejvhodnější postupy metody chromatografické. Jedna ze studií z roku 2015, zabývající se izolací melittinu, využila chromatografii na obrácené fázi, tedy RP-HPLC (Mahmoodzadeh et al., 2015). Izolace melittinu touto metodou spočívá v jeho hydrofobní interakci s nepolární stacionární fází v koloně (zde kolona C18). Nepolární části peptidu, tedy nepolární aminokyselinové zbytky, jsou adsorbovány na stacionární fázi a tímto zachycením je zpomalována eluce melittinu oproti dalším složkám včelího jedu. Tato metoda je obecně vhodná pro izolaci biopolymerů a v tomto případě je použitelná díky amfipatickému charakteru melittinu (Mahmoodzadeh et al., 2015).

Vzhledem k tomu, že se jedná o chromatografii na obrácené fázi, je stacionární fáze méně polární než mobilní. Ve studii od Mahmoodzadeh et al., 2015 byla použita mobilní fáze o složení kyseliny trifluoroctové s vodou v poměru 1:1000. Melittin byl tak svými nepolárními aminokyselinovými zbytky schopen hydrofobně interagovat se stacionární fází a byl zpomalován. Eluce probíhala směsí kyseliny trifluoroctové a acetonitrilu opět v poměru 1:1000. Množství elučního roztoku se lineárně zvyšovalo, čímž se snížila polarita mobilní fáze a umožnila tak eluci melittinu.

V roce 2017 byla publikována studie od kolektivu Teoh et al., kde kromě hydrofobní chromatografie využili chromatografii na iontoměničích. Tento krok se autorům článku zdál nezbytný, jelikož právě ionexová chromatografie umožnila dobré přečištění melittinu a zbavení se enzymů, které by mohly jakožto alergeny při další práci s melittinem představovat jisté riziko.

Jak již bylo zmíněno, melittin má celkový náboj kladný, tudíž je vhodné pro jeho izolaci ze vzorku použít katex jako výplň chromatografické kolony. Ve studii použili dva typy katexů pro porovnání, slabý katex karboxymethyl Sepharosa Fast Flow (CM-FF) a silný katex sulfopropyl Sepharosa Fast Flow (SP-FF). Ukázalo se, že zvolený slabý katex je nevhodný z více důvodů, mezi něž patří omezená stabilita CM-FF při nízkém pH

a dále nedostatečný výtěžek melittinu po izolaci. Eluce byla provedena změnou iontové síly pomocí elučního pufru, v němž lineárně anebo skokově rostla koncentrace NaCl z 0 na $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

V této studii z r. 2017 je rovněž testován vhodný pufr pro iontoměničovou chromatografii. Pokud by purifikace probíhala za použití velmi kyselého pufru, oba alergeny (bvPLA2 a hyaluronidasa) by dostaly kladný náboj a s katexem by reagovaly stejně jako melittin, což by vedlo ke špatné purifikaci. Autoři nakonec zvolili fosfátový pufr o pH 6 (Teoh et al., 2017).

Po chromatografické separaci melittinu byla provedena elektroforéza na polyakrylamidovém gelu s přidáním dodecylsírnanu sodného (SDS-PAGE), pomocí níž bylo analyzováno a určeno, ve které frakci se melittin nachází. Elektroforéza se řadí mezi elektromigrační metody, při níž se molekuly rozdělují na základě své velikosti a mobility v elektrickém poli. Přídavek dodecylsírnanu sodného udělí všem složkám vzorku uniformní záporný náboj, díky čemuž se molekuly pohybují pouze podle své velikosti. Molekuly putují k anodě, která je kladně nabitá. Pro detekci jednotlivých složek v jednotlivých frakcích chromatograficky separovaného včelího jedu byl pro SDS-PAGE analýzu použit standard melittinu, bvPLA2 i hyaluronidasy.

Pro vizualizaci proteinů na gelu se používají různá barviva. Nejčastěji používanými barvivy jsou Coomassie Brilliant Blue G-250 a stříbro. Principem barvení pomocí G-250 v kyselém prostředí je navázání barviva na kladně nabitě aminokyselinové zbytky v proteinu a také díky slabým Van der Waalsovým interakcím. Autoři použili barvivo InstantBlue, které je velmi podobné G-250 s malými změnami v protokolu. Barvení stříbrem spočívá v redukci stříbrných iontů některými aminokyselinovými zbytky (např. Cys, Met, Arg, His, Lys), což se projeví žlutohnědou barvou (Diezel et al., 1972; Smejkal, 2014).

2.4 Studium antimikrobiálních účinků včelího jedu a melittinu

VJ, stejně tak jako jeho majoritní složka melittin, vykazuje antimikrobiální aktivitu. Jak již bylo zmíněno, melittin je schopen interagovat s povrchem buněčných membrán a následně v membránách vytvořit póry. Právě vznik dostatečného množství pórů vede k zabití buňky, jelikož je narušena buněčná integrita a intracelulární obsah se vyleje z buňky ven (Tosteson & Tosteson, 1981; Carpena et al., 2020).

Také bvPLA2 je také schopna působit cytotoxicky, ačkoliv jiným mechanismem. Působením bvPLA2 dochází k hydrolytickému štěpení fosfolipidů v biologické membráně. K antimikrobiální aktivitě včelího jedu přispívají hlavně melittin a bvPLA2.

Studium antimikrobiální aktivity včelího jedu, respektive melittinu je důležité z hlediska produkce nových látek s antimikrobiálním účinkem, která by působila i na rezistentní druhy mikrobiálních organismů. Příkladem je MRSA, na něž dostupná antibiotika nepůsobí. Tento *S. aureus* je znám svým výskytem ve zdravotnických zařízeních, kde způsobuje špatně léčitelné infekce, mezi které patří i abscesy a zápal plic (Choi et al., 2015).

V jedné ze studií účinků včelího jedu, resp. melittinu na MRSA se Choi et al., 2015 zabývají rozsahem antimikrobiální aktivity včelího jedu, resp. purifikovaného a syntetického melittinu. Ve studii od Choi et al., 2015 byly antimikrobiální účinky včelího jedu a melittinu testovány mimo jiné na mikroorganismech *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus Newman*, *Staphylococcus aureus MRSA1* a *Staphylococcus aureus MRSA2* s přednostním zaměřením na MRSA (Choi et al., 2015). Studium antimikrobiálních účinků včelího jedu *in vitro* bylo provedeno stanovením minimální inhibiční koncentrace (angl. „minimum inhibitory concentration“, MIC), což je minimální koncentrace antimikrobiální látky, při které ještě není mikrobiální růst pozorovatelný (Frébortová, 2008).

Testování antimikrobiálních účinků včelího jedu, resp. melittinu na *S. aureus in vivo* bylo realizováno studií na myších, které byly infikovány bakteriemi (injekčně do dutiny břišní nebo podkoží. V případě injekce do dutiny břišní byl VJ/melittin injekčně aplikován hodinu po infikování bakteriemi. Při kožní infekci byl VJ/melittin aplikován jednou denně na místo poškození.

Výsledky této studie prokázaly efektivní antimikrobiální aktivitu surového VJ proti G⁺ bakteriím *in vitro*, ovšem *in vivo* se u jedu objevila vyšší úmrtnost myši než bez aplikace

jedu. To je přisuzováno mimo jiné přítomnosti bvPLA2, která mohla iniciovat alergickou reakci, což vedlo k rozvoji zánětu, který dále oslabil myší organismus.

Aplikace melittinu samotného vedla k potvrzení antibakteriální aktivity proti MRSA *in vitro*, a zároveň byly prokázány pozitivní účinky melittinu *in vivo*. Kromě přímého poškození bakteriálních buněk měl melittin protizánětlivé účinky, které byly pozorovány jako odpověď imunitního systému, čímž zabránil dalšímu rozvoji infekce.

Ve studii Leandro et al., 2015 byla testována antimikrobiální aktivita a stanovována MIC surového VJ, melittinu a bvPLA2 na několika patogenech vyskytujících se v ústní dutině (např. *S.mutans*, *Lactobacillus casei*, *Enterococcus faecalis*), a to v rámci prevence vzniku zubních kazů. Ve studii se pracovalo s komerčně dostupným VJ, melittinem a bvPLA2 a také VJ *in natura* (v přirozené podobě). MIC byla stanovena uspořádáním experimentu v 96-jamkové mikrotitrační destičce. Vzorky látek s antimikrobiálním účinkem byly rozpuštěny v tryptickém sojovém bujónu, aby byly výsledné koncentrace v rozmezí 4 - 400 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Inokulum před testováním byl upraveno při vlnové délce 625 nm na $5\cdot 10^5$ kolonii tvořící jednotky (z angl. „colony-forming unit, CFU). Po 24 hodinách od aplikace antimikrobiálních látek k bakteriálním suspenzím byl bakteriální růst určen pomocí resazurinu, který v důsledku jeho redukce dehydrogenasami živých mikroorganismů metabolizován a mění barvu z modré na růžovou. Množství redukovaného resazurinu, tj. růžové formy, je úměrné množství žijících organismů.

Výsledky této studie prokázaly, že největší antimikrobiální aktivitu vykazoval melittin, jehož hodnoty MIC pro jednotlivé organismy byly v rozmezí 4–400 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Nejmenší hodnota MIC melittinu byla pozorována pro bakterii *L. casei*. Naproti tomu MIC bvPLA2 dosahovaly hodnoty rovné či vyšší než 400 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ u všech mikroorganismů, což pro tuto studii bylo nevyhovující (Leandro et al., 2015).

3 Experimentální část

3.1 Materiál

3.1.1 Chemikálie

Agar (Sigma-Aldrich, USA)

Glukosa (Sigma-Aldrich, USA)

Hydrogenuhličitan draselný (Penta, Česká republika)

Chloramfenikol (Serva, Německo)

Chlorid sodný (Lach-Ner, Česká republika)

Kanamycin monosulfát (Duchefa Biochemie, Nizozemsko)

Kvasničný extrakt (Carl Roth, Německo)

Melittin ze včelího jedu (Sigma-Aldrich, USA)

Mueller Hinton broth (Carl Roth, Německo)

Pyruvát sodný (Sigma-Aldrich, USA)

Tetracyklin hydrochlorid (Duchefa Biochemie, Nizozemsko)

3.1.2 Biologický materiál

Testované mikrobiální kmeny byly získány z České sbírky mikroorganismů (CCM):

Escherichia coli CCM 7395

Paenibacillus larvae CCM 4483

Paenibacillus larvae CCM 4484

Micrococcus luteus CCM 732

Pichia pastoris CCM X-33

Včelí jed – rodinná včelstva p. Uhlíře (umístěna na různých stanovištích v Olomouckém kraji); vzorky jedu odebrány metodou elektrické stimulace, následná lyofilizace a uchování při -30 °C

3.1.3 Přístroje a vybavení

Analytická váha Denver Instrument SI-114 (Sartorius, Německo)

Automatické pipety (Eppendorf, Německo)

Digitální předvážky (Radwag, Česká republika)

Elektromagnetická míchačka IKA (Labicom, Česká republika)

Flowbox Bioban (Steril, Itálie)

Mikrodestičkový spektrofotometr Epoch (BioTek Instruments, USA)

Mikrodestičkový spektrofotometr Reader Synergy H1 (BioTek Instruments, USA)

Parní sterilizátor (Tuttnauer, Israel)

Spektrofotometr Lightwave 3 (Biochrom, VB)

Vortex V-1 Plus (Biosan, Litva)

3.1.4 Použitá média a roztoky

- MYPGP médium: 10 g·l⁻¹ Muller Hinton broth, 15 g·l⁻¹ kvasničný extrakt, 3 g·l⁻¹ K₂HPO₄, 1 g·l⁻¹ pyruvát sodný

- MYPGP agar: 10 g·l⁻¹ Muller Hinton broth, 15 g·l⁻¹ kvasničný extrakt, 3 g·l⁻¹ K₂HPO₄, 1 g·l⁻¹ pyruvát sodný, 20 g·l⁻¹ agar

- Fyziologický roztok: 0,9% NaCl a 1% glukosa

- Krevní agar Columbia (Dulab, Česká republika)

Do připravených médií (tekutého i pevného) bylo přidáno 20 ml·l⁻¹ 10% sterilní glukosy po autoklávování. Média s agarem byla za sterilních podmínek nalévána ve flowboxu do Petriho misek do výšky 0,5 cm. Misky s plotnami pak byly uchovávány v lednici. Fyziologický roztok a tekuté MYPGP médium bylo uchovááno v lednici.

3.2 Metody

3.2.1 Příprava zásobních a pracovních roztoků včelího jedu a melittinu.

Lyofilizovaný včelí jed (VJ) byl rozpuštěn ve sterilní vodě na zásobní roztok o koncentraci 10 mg·ml⁻¹ a uchováván v mrazáku při teplotě -30 °C. Syntetický melittin ze včelího jedu (Sigma-Aldrich) byl rozpuštěn ve vodě na koncentraci 1000 µg·ml⁻¹ a uchován v mrazáku při -30 °C. V případě přípravy pracovních roztoků byl VJ i melittin ředěn ve sterilním fyziologickém roztoku, případně v tekutém MYPG médiu dle požadavků následných analýz.

3.2.2 Oživování zálohovaných bakteriálních kultur

Alikvoty vybraných zálohovaných bakteriálních kultur (*E. coli* CCM 7395, *M. luteus* CCM 732, *P. larvae* CCM 4483, *P. larvae* CCM 4484) byly rozmrazeny (z -60 °C) na laboratorní teplotu (25 °C). Po jejich rozmražení byl obsah alikvotů promíchán opatrným převrácením mikrozkušavky. Z mikrozkušavky bylo následně odebráno 80 µl příslušné kultury, která byla aplikována na Petriho misku s MYPGP agarem a rozetřena plastovou roztěrkou. Tento postup byl opakován pro všechny mikroorganismy (MO). Kultivace MO probíhala při 37 °C po dobu 24 (*E. coli*) nebo

48-72 hodin (oba kmeny *P. larvae* a *M. luteus*). Kultivace kvasinky *P. pastoris* proběhla po inokulaci sterilní agarové plotny mikroorganismem ze zásobní kultury po dobu 48 hodin při 30 °C ve tmě.

3.2.3 Určení kolonie tvořící jednotky

Byla nachystána sada 8 mikrozkušavek označených čísly 1–8 (tzn. ředění $10^{-1} - 10^{-8}$), do nichž bylo napipetováno 900 μl tekutého MYPGP média, případně fyziologického roztoku. Dále byla připravena suspenze vybraného mikroorganismu v MYPGP médiu nebo fyziologickém roztoku, jejíž optická hustota dosahovala při vlnové délce 600 nm hodnoty 0,1. Po opatrném protřepání mikrobiální suspenze bylo vždy odebráno po 100 μl , které byly následně pipetovány do mikrozkušavky č. 1 (výsledný objem ve zkumavce = 1000 μl , ředění 10x, tj. 10^{-1}). Tato mikrozkušavka byla vortexována a dále z ní bylo asepticky odebráno 100 μl do mikrozkušavky č. 2 (další ředění 10x, tj. ředění 10^{-2}). Ze zkumavky č. 2 bylo odebráno 100 μl , které byly pipetovány do mikrozkušavky č. 3 (další ředění 10x, tj. ředění 10^{-3}). Takto byla vytvořena postupná ředící řada mikrobiální suspenze až po ředění 10^{-8} . Jakmile byla řada připravena, z každé z mikrozkušavek bylo odebráno 200 μl suspenze na agarovou plotnu s MYPG médiem, které byly pomocí vatové tyčinky rozetřeny pomocí tahů v několika směrech (3x otočení misky o 60 ° oproti předchozímu směru), čímž byl zajištěn rovnoměrný nárůst MO po celém povrchu plotny. Podle počtu kolonií byla vypočtena kolonie tvořící jednotka (KTJ) (Frébortová, 2008). Výpočet KTJ byl proveden podle rovnice:

$$\text{KTJ} = \frac{\text{počet kolonií na plotně}}{\text{ředění}} \cdot \frac{1}{\text{objem suspenze aplikovaný na plotnu [ml]}}$$

3.2.4 Očkování média testovaným mikroorganismem

Z kolonií daného mikroorganismu (bakterie, kvasinka) narostlých na agarových plotnách byla připravena mikrobiální suspenze v tekutém MYPGP médiu, jejíž optická hustota (angl. „optical density“, OD) dosahovala při vlnové délce 600 nm hodnoty 0,1 ($\text{OD}_{600} = 0,1$). Z této suspenze bylo odebráno 100 μl , které byly aplikovány do středu pevného média v Petriho misce a následně rozetřeny vatovou tyčinkou pomocí tahů v několika směrech (3x otočení misky o 60 ° oproti předchozímu směru). Po zaschnutí mikrobiální suspenze byla na dané médium aplikována testovaná antimikrobiální látka (VJ, melittin).

3.2.5 Testování antimikrobiální aktivity VJ pomocí difúzních testů

Po naočkování misek daným mikroorganismem byl na misky aplikován VJ a melittin. Zásobní roztok včelího jedu i zásobní roztok melittinu byl ředěn ve fyziologickém roztoku na zvolené koncentrace. Pilotní testování antimikrobiální aktivity včelího jedu bylo provedeno třemi způsoby – aplikací látky na papírové disky, aplikací do jamek v médiu a přímou aplikací jedu nebo melittinu na misku. Pro pilotní testování pomocí papírových disků, jamek v médiu a přímé aplikace byl zvolen grampozitivní *M. luteus* (bakteriální suspenze o $OD_{600} = 0,1$), a to za účelem výběru nejvhodnější aplikace testované antimikrobiální látky.

3.2.5.1 Aplikace antimikrobiální látky v podobě papírových disků

Na papírové disky bylo nanášeno 5 μl roztoku včelího jedu ($c = 0,1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; $1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a 5 μl pozitivní kontroly v podobě antibiotika (CHL, koncentrace $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a $30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Jakmile se látka vsákla do papírového disku, byly tyto disky aplikovány pomocí sterilní pinzety na agarové plotny s naočkováným MO (*M. luteus*). Tyto misky byly následně po aplikaci VJ inkubovány víčkem vzhůru při teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 48 hodin.

3.2.5.2 Aplikace antimikrobiální látky do jamek v pevném médiu

Do MYPGP agarů byly pomocí sterilního korkovrtu vykrojeno šest jamek o průměru 5 mm. Následně byl na médium naočkován *M. luteus* a do jamek v médiu byl aplikován VJ (1 μl , 2 μl , 5 μl a 10 μl o koncentraci $1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; dále 1 μl a 10 μl o koncentraci $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Jako pozitivní kontrola byl použit CHL (5 μl a 1 μl o koncentraci $30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; 5 μl a 1 μl o koncentraci $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; 5 μl a 1 μl o koncentraci $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Misky s naočkováným MO byly po aplikaci VJ inkubovány víčkem vzhůru při teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 48 hodin.

3.2.5.3 Aplikace antimikrobiální látky přímo na misku

Na misku naočkovanou mikroorganismem bylo aplikováno 5 μl VJ (koncentrace: $1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), melittinu (koncentrace: $250 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; $1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) nebo pozitivní kontroly v podobě zvoleného antibiotika (koncentrace $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; $30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; $250 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$;) na předem vyznačená místa. Misky s naočkováným MO byly po aplikaci testované látky

(VJ, melittin, pozitivní kontrola v podobě antibiotika) inkubovány víčkem vzhůru při teplotě 37 °C po dobu 48 hodin.

3.2.6 Stanovení růstové křivky mikroorganismů

Měřením optické hustoty mikrobiální suspenze během její kultivace byla stanovena růstová křivka jednotlivých mikroorganismů v přítomnosti včelího jedu. Měření probíhalo v 96 jamkové mikrotitrační destičce. Do jednotlivých jamek v případě analyzovaných vzorků bylo napipetováno 50 μl mikrobiální kultury a 50 μl VJ nebo negativní kontroly v podobě antibiotika v tekutém MYPGP médiu. Jed byl naředěn v MYPGP médiu na koncentrace 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 75 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 125 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 250 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 375 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 750 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Pro experiment byly do jamek mikrotitrační destičky dále pipetovány negativní a pozitivní kontroly bakteriálního růstu a blank. Jako negativní kontrola bakteriálního růstu sloužil chloramfenikol (CHL) a tetracyklin (TTC) v MYPGP médiu o koncentracích 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro *M. luteus*, *P. larvae* a *P. pastoris*. Negativní kontrola v případě *E. coli* byl kanamycin (KAN) v MYPGP médiu o koncentracích 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Pozitivní kontrola bakteriálního růstu byla reprezentována 50 μl mikrobiální suspenze s 50 μl MYPGP média. Blank představovalo 100 μl sterilního MYPGP média. Měření OD probíhalo při vlnové délce 600 nm ve 30ti minutových intervalech po dobu 16 hodin při 37 °C (*P. larvae*, *M. luteus*, *E. coli*), nebo 30 °C (*P. pastoris*). Naměřené hodnoty optické hustoty při vlnové délce 600 nm v závislosti na čase (tj. růstové křivky MO) byly zpracovány v programu Microsoft Excel 365.

3.2.7 Testování hemolytických účinků včelího jedu a melittinu

Přímou aplikací VJ a melittinu na krevní agar (krevní agar Columbia, Dulab) byly testovány jejich hemolytické účinky. Na misku s krevním agarem bylo vždy aplikováno 5 μl VJ nebo melittinu o požadované koncentraci. Koncentrace VJ použité pro toto testování byly 0,1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a 5000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Koncentrace melittinu byly 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a 250 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Po aplikaci antimikrobiální látky byly krevní agary inkubovány při 37 °C po dobu 24 hodin.

3.2.8 Testování hemolytických účinků testovaných mikroorganismů.

V rámci práce se včelím jedem a krevním agarem je nutné otestovat, zdali zvolené mikroorganismy samy nepůsobí hemolyticky. Z daného mikroorganismu byla připravena suspenze v tekutém MYPGP médiu, jejíž optická hustota dosahovala při vlnové délce 600 nm hodnoty 0,1 ($OD_{600} = 0,1$). Z této suspenze bylo odebráno 100 μ l, které byly aplikovány do středu krevního agaru a následně rozetřeny vatovou tyčinkou pomocí tahů v několika směrech (3x otočení misky o 60 ° oproti předchozímu směru). Naočkované misky byly kultivovány dnem vzhůru při 37 °C (*P. larvae*, *M. luteus*, *E. coli*) nebo 30 °C (*P. pastoris*) po dobu 24 hodin (*E. coli*), 48 hodin (*M. luteus*, *P. pastoris*) nebo 72 hodin (*P. larvae*).

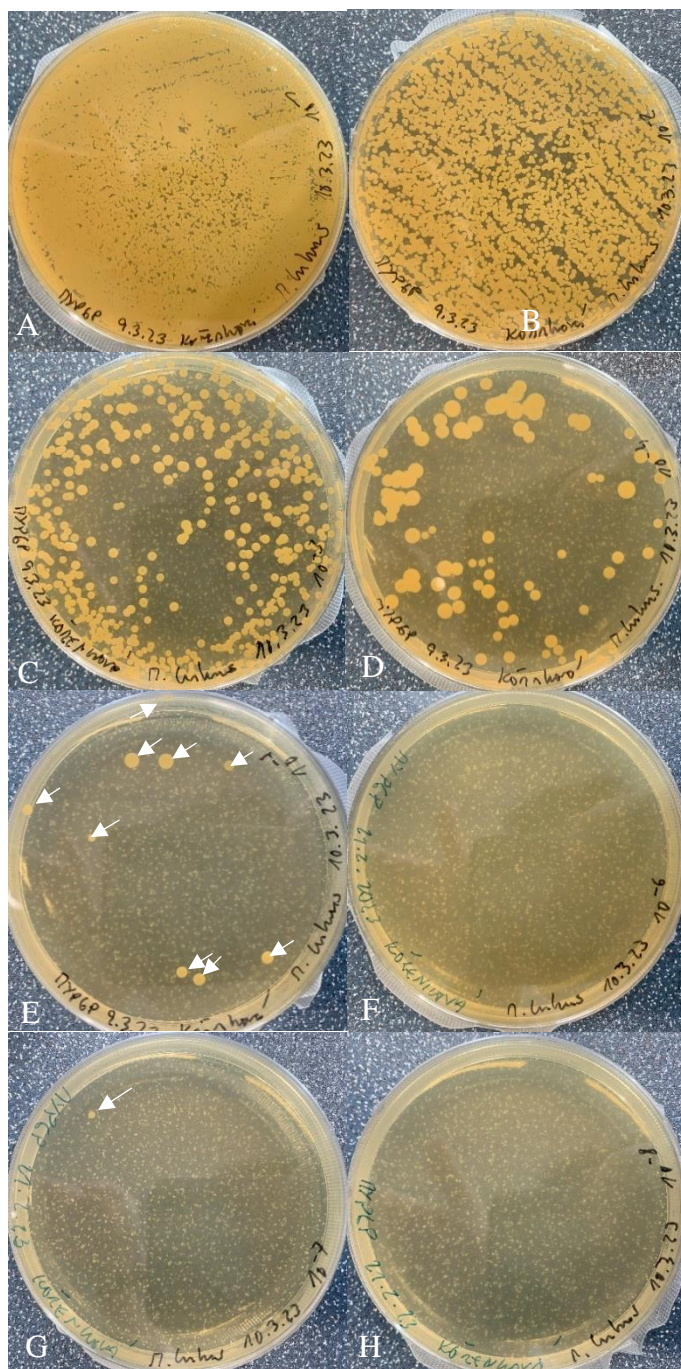
4 Výsledky a vyhodnocení

4.1 Určení kolonie tvořící jednotky

4.1.1 Určení kolonie tvořící jednotky pro *M. luteus* CCM 732

Kolonie tvořící jednotka (KTJ) je parametr, který určuje počet kolonií v jednotce objemu mikrobiální suspenze, a je tak charakteristikou dané testované mikrobiální kultury, např. pro testování antimikrobiální aktivity studované látky (Nandy & Venkatesh, 2014). Určování počtu mikroorganismů bylo provedeno pro bakteriální suspenze o hustotě $OD_{600} = 0,1$, na kterou byly mikrobiální kultury před každým experimentem upraveny. Tímto krokem bylo zajištěno, že do experimentu vstupuje stejný počet mikroorganismů.

Kolonie tvořící jednotky pro *M. luteus* CCM 732 byly stanoveny podle počtu kolonií na miskách s MYPG médiem po 48 hodinách kultivace MO při teplotě 37 °C (Obr. 5A-H). Vypočtené hodnoty KTJ pro *M. luteus* CCM 732 jsou shrnuty v tabulce 2.



Obr. 5A-H: Kolonie *M. luteus* CCM 732 na MYPG médiu po inokulaci postupně ředěnou bakteriální suspenzí; A = ředění 10^{-1} ; B = ředění 10^{-2} ; C ředění 10^{-3} ; D = ředění 10^{-4} ; E = ředění 10^{-5} ; F = ředění 10^{-6} ; G = ředění 10^{-7} ; H = ředění 10^{-8} . Kultivace probíhala při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 48 hodin.

Tab. 2: Vypočtené hodnoty KTJ *M. luteus* CCM 732 dle pozorovaného počtu izolovaných kolonií pro jednotlivá ředění bakteriální suspenze

<i>M. luteus</i> CCM 732								
Počet kolonií	Souvislý nárůst	4360	551	109	9	0	1	0
Ředění	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
KTJ*	x	$2,18 \cdot 10^6$	$2,76 \cdot 10^6$	$5,45 \cdot 10^6$	$4,50 \cdot 10^6$	x	$5,00 \cdot 10^7$	x

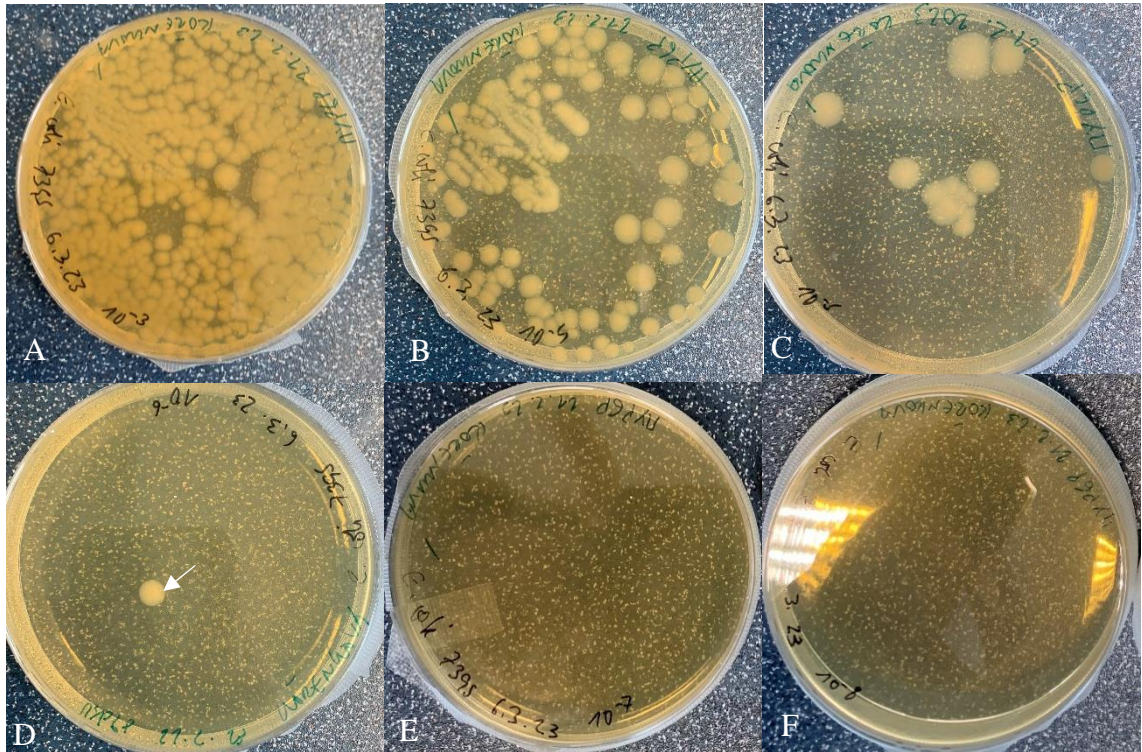
* KTJ – kolonie tvořící jednotka

KTJ se dle pravidel počítá z misek, kde je počet kolonií 30–300 (Frébortová, 2008). V případě *M. luteus* CCM 732 se jedná pouze o ředění 10^{-4} , tedy KTJ *M. luteus* CCM 732 je $5,45 \cdot 10^6$ mikroorganismů.

4.1.2 Určení kolonie tvořící jednotky pro *E. coli* CCM 7395

Pro stanovení počtu KTJ pro *E. coli* CCM 7395 bylo inokulováno 6 misek s MYPG médiem postupně ředěnou bakteriální kulturou, počáteční o $OD_{600} = 0,1$; agarové plotny byly inokulovány bakteriálními suspenzemi v rozsahu ředění 10^{-3} – 10^{-8} .

Kolonie tvořící jednotky pro *E. coli* CCM 7395 byly stanoveny podle počtu kolonií na miskách s MYPG médiem, nárůst po 24 hodinách kultivace při teplotě 37 °C. Výsledná KTJ byla počítána z agarové ploty s ředěním 10^{-4} (podle pravidla 30 – 300 kolonií), hodnota KTJ pro *E. coli* CCM 7395 je tedy $1,52 \cdot 10^7$ mikroorganismů (Obr. 6A-H). Hodnoty jednotlivých KTJ jsou shrnuty v tabulce 3.



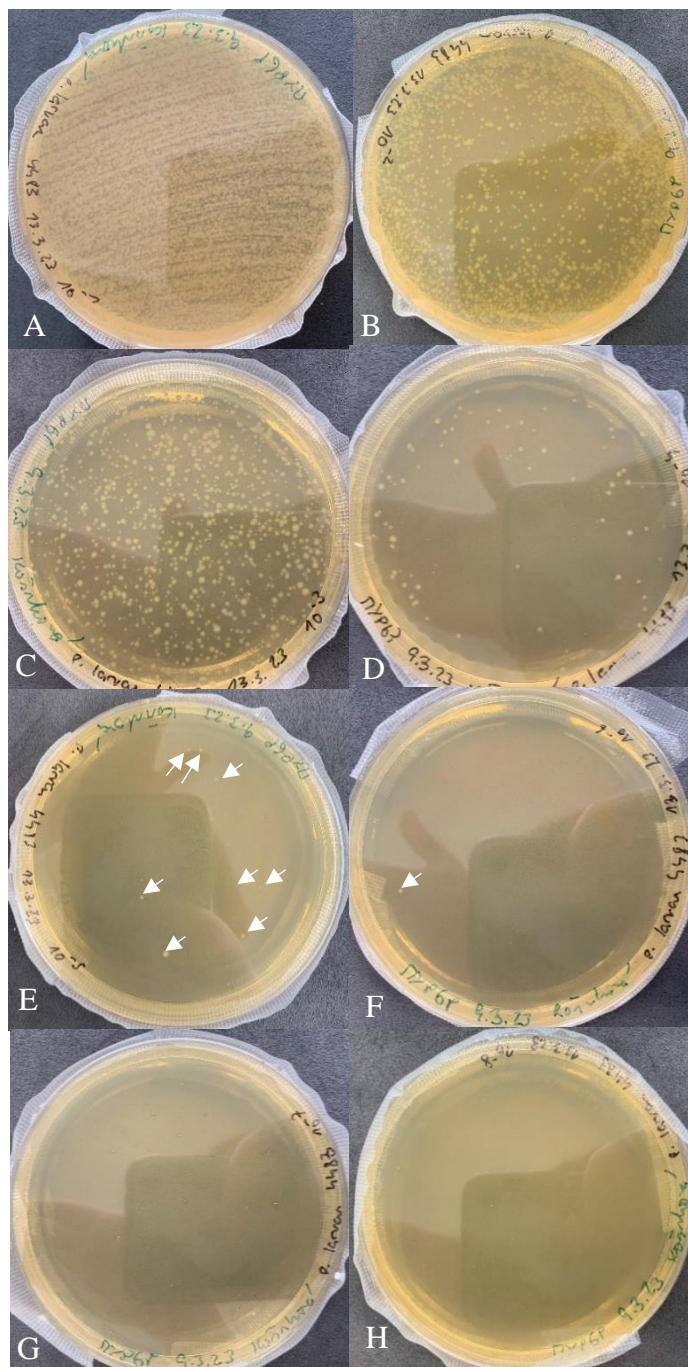
Obr. 6A-H: Kolonie *E. coli* CCM 7395 na MYPG médiu po inokulaci postupně ředěnou bakteriální suspenzí; A = ředění 10^{-1} ; B = ředění 10^{-2} ; C ředění 10^{-3} ; D = ředění 10^{-4} ; E = ředění 10^{-5} ; F = ředění 10^{-6} ; G = ředění 10^{-7} ; H = ředění 10^{-8} . Kultivace probíhala při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 24 hodin.

Tab. 3: Vypočtené hodnoty KTJ *E. coli* CCM 7395 dle pozorovaného počtu izolovaných kolonií pro jednotlivá ředění bakteriální suspenze

<i>E. coli</i> CCM 7395						
Počet kolonií	541	152	14	1	0	0
Ředění	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
KTJ	$5,41 \cdot 10^6$	$1,52 \cdot 10^7$	$1,40 \cdot 10^7$	$1,00 \cdot 10^7$	x	x

4.1.3 Určení kolonie tvořící jednotky pro *P. larvae* CCM 4483

Určování počtu MO bylo provedeno pro bakteriální suspenze o optické hustotě $OD_{600} = 0,1$. Kolonie tvořící jednotky pro *P. larvae* CCM 4483 byly stanoveny podle počtu kolonií na miskách s MYPG médiem po 72 hodinách kultivace MO při teplotě 37 °C. Výsledná KTJ byla počítána z agarové plotny s ředěním 10^{-4} (podle pravidla 30 – 300 kolonií), hodnota KTJ pro *P. larvae* CCM 4483 je tedy $5,20 \cdot 10^6$ mikroorganismů (Obr. 7A-H). Hodnoty jednotlivých KTJ jsou shrnuty v tabulce 4.



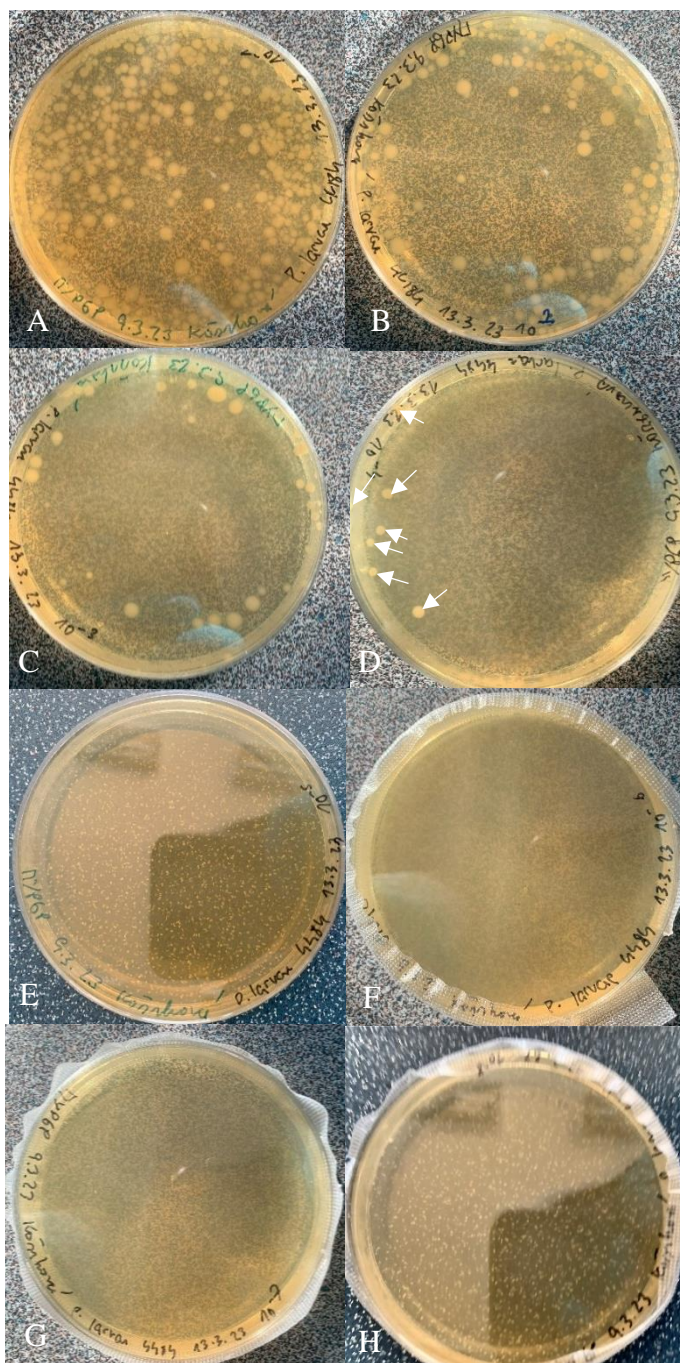
Obr. 7A-H: Kolonie *P. larvae* CCM 4483 na MYPG médiu po inokulaci postupně ředěnou bakteriální suspenzí; A = ředění 10^{-1} ; B = ředění 10^{-2} ; C ředění 10^{-3} ; D = ředění 10^{-4} ; E = ředění 10^{-5} ; F = ředění 10^{-6} ; G = ředění 10^{-7} ; H = ředění 10^{-8} . Kultivace probíhala při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 72 hodin.

Tab. 4 Vypočtené hodnoty KTJ *P. larvae* CCM 4483 dle pozorovaného počtu izolovaných kolonií pro jednotlivá ředění bakteriální suspenze

<i>P. larvae</i> CCM 4483								
Počet kolonií	Souvislý nárůst	Souvislý nárůst	1195	104	8	1	0	0
Ředění	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
KTJ	x	x	$5,98 \cdot 10^6$	$5,20 \cdot 10^6$	$4,00 \cdot 10^6$	$5,00 \cdot 10^6$	x	x

4.1.4 Určení kolonie tvořící jednotky pro *P. larvae* CCM 4484

Kolonie tvořící jednotky pro *P. larvae* CCM 4484 (bakteriální suspenze o $OD_{600} = 0,1$) byly stanoveny podle počtu kolonií na miskách s MYPG médiem po 72 hodinách kultivace MO při teplotě 37 °C. Výsledná KTJ byla počítána z agarové plotny s ředěním 10^{-2} a 10^{-3} (podle pravidla 30 – 300 kolonií), průměrná hodnota KTJ pro *P. larvae* CCM 4484 je tedy $1,42 \cdot 10^5 \pm 0,43 \cdot 10^5$ mikroorganismů (Obr. 8A-H). Hodnoty jednotlivých KTJ jsou shrnuty v tabulce 5.



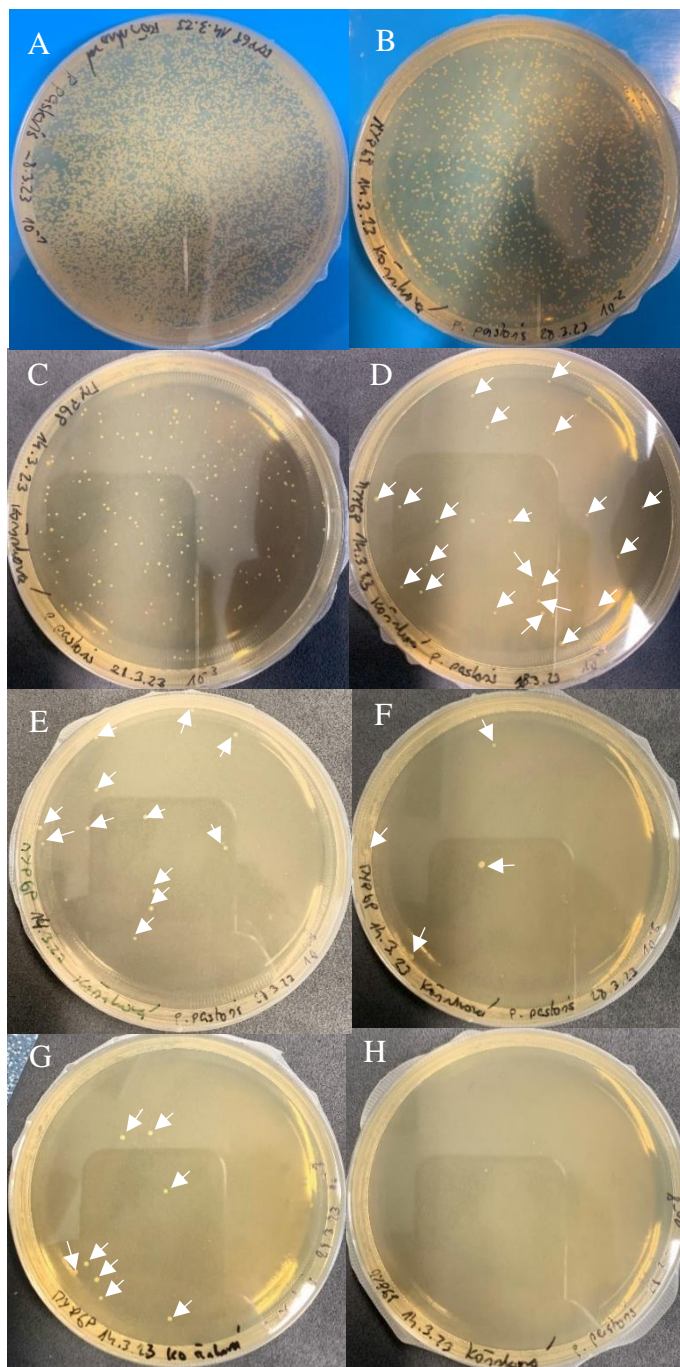
Obr. 8A-H: Kolonie *P. larvae* CCM 4484 na MYPG médiu po inokulaci postupně ředěnou bakteriální suspenzí; A = ředění 10^{-1} ; B = ředění 10^{-2} ; C ředění 10^{-3} ; D = ředění 10^{-4} ; E = ředění 10^{-5} ; F = ředění 10^{-6} ; G = ředění 10^{-7} ; H = ředění 10^{-8} . Kultivace probíhala při 37 °C po dobu 72 hodin.

Tab. 5 Vypočtené hodnoty KTJ *P. larvae CCM 4484* dle pozorovaného počtu izolovaných kolonií pro jednotlivá ředění bakteriální suspenze

<i>P. larvae CCM 4484</i>								
Počet kolonií	1004	199	37	7	0	0	0	0
Ředění	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸
KTJ	5,02·10 ⁴	9,95·10 ⁴	1,85·10 ⁵	3,50·10 ⁵	x	x	x	x

4.1.5 Určení kolonie tvořící jednotky pro *P. pastoris CCM X-33*

Kolonie tvořící jednotky pro mikrobiální suspenzi kvasinky *P. pastoris CCM X-33* (OD₆₀₀ = 0,1) byly stanoveny podle počtu kolonií na miskách s MYPG médiem po 48 hodinách kultivace MO při teplotě 30 °C. Výsledná KTJ byla počítána z agarové plotny s ředěním 10⁻³ (podle pravidla 30 – 300 kolonií), hodnota KTJ pro *P. pastoris CCM X-33* je tedy 1.06·10⁶ mikroorganismů (Obr. 9A-H). Hodnoty jednotlivých KTJ jsou shrnuty v tabulce 6.



Obr. 9A-H: Kolonie *P. pastoris* CCM X-33 na MYPG médiu po inokulaci postupně ředěnou mikrobiální suspenzí; A = ředění 10^{-1} ; B = ředění 10^{-2} ; C ředění 10^{-3} ; D = ředění 10^{-4} ; E = ředění 10^{-5} ; F = ředění 10^{-6} ; G = ředění 10^{-7} ; H = ředění 10^{-8} . Kultivace probíhala při 30 °C po dobu 48 hodin.

Tab. 6: Vypočtené hodnoty KTJ *P. pastoris* CCM X-33 dle pozorovaného počtu izolovaných kolonií pro jednotlivá ředění bakteriální suspenze

<i>P. pastoris</i> CCM X-33								
Počet kolonií	Souvislý nárůst	1528	211	21	13	4	9	0
Ředění	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
KTJ	x	$7,64 \cdot 10^5$	$1,06 \cdot 10^6$	$1,05 \cdot 10^6$	$6,50 \cdot 10^6$	$2,00 \cdot 10^7$	$4,50 \cdot 10^9$	x

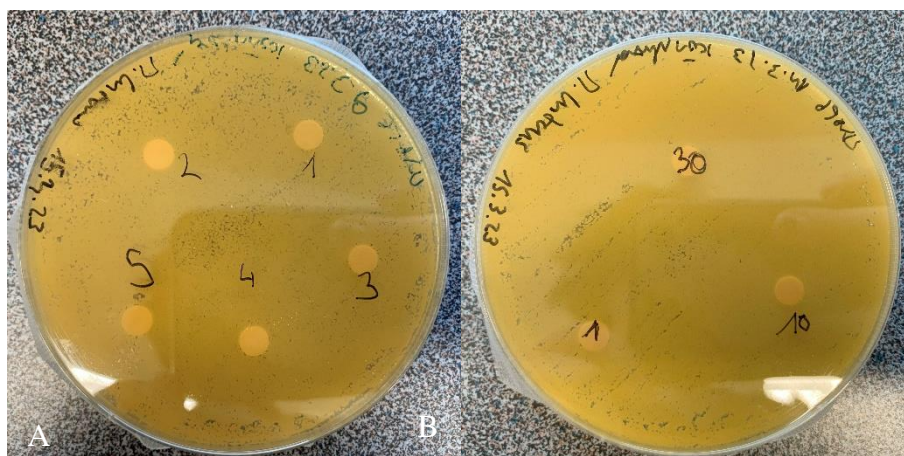
4.2 Testování antimikrobiálních účinků včelího jedu a melittinu

Antibakteriální účinky včelího jedu jsou silnější vůči G^+ bakteriím, které nemají buněčnou chráněnou vrstvou lipopolysacharidů, jak je tomu u G^- bakterií (El-Seedi et al., 2020; Zolfagharian et al., 2016). Při testování antimikrobiálních účinků na kvasinku *Candida albicans* byly potvrzeny antifungální účinky, ovšem jejich efektivita byla nižší než např. léčiva Amfotericinu B nebo Fluconazolu (Lee, 2016). V rámci praktické části bakalářské práce z bezpečnostních důvodů pracujeme s jiným zástupcem kvasinkových mikroorganismů, konkrétně *P. pastoris*. Jako pozitivní kontrola antimikrobiálního účinku byla zvolena antibiotika (atb) chloramfenikol (CHL) a tetracyklin (TTC) pro G^+ bakterie a kvasinku (Kochansky et al., 2001; Olajuyigbe & Coopoosamy, 2014; Haon et al., 2015). Jako pozitivní kontrola antimikrobiálního účinku pro *E. coli* CCM 7395 sloužilo atb kanamycin (KAN) (Bafna et al., 2020).

4.2.1 Difúzní testy

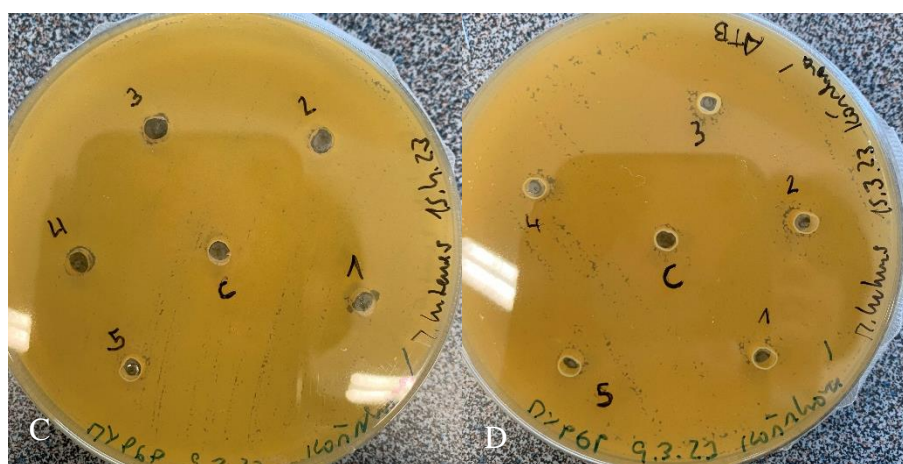
Pro výběr vhodné techniky difúzních metod pro sledování antimikrobiálního účinku včelího jedu byl vybrán mikroorganismus *M. luteus* CCM 732, vůči němuž byly účinky včelího jedu již prokázány (Maitip et al., 2021). Byly zvoleny tři způsoby aplikace včelího jedu: aplikace pomocí papírových disků, aplikace do jamek vykrojených v médiu a aplikace přímo na misku (Votava et al., 2010).

Aplikace včelího jedu na plotnu v podobě papírových disků za zvolených podmínek neprokázala žádné účinky na bakteriální růst *M. luteus* – výsledek byl negativní (Obr. 10A), proto se tedy ukázala jako nevhodná pro vybraný způsob testování antimikrobiální aktivity VJ. Inhibiční zóna nebyla viditelná jak pro VJ, tak pozitivní kontrolu antimikrobiálního účinku v podobě antibiotika (CHL) (Obr. 10B). Příčinou mohla být nevhodně zvolená koncentrace atb, ačkoli se tyto koncentrace pro kontrolu mikrobiálního růstu používají (Čivljak et al., 2013).



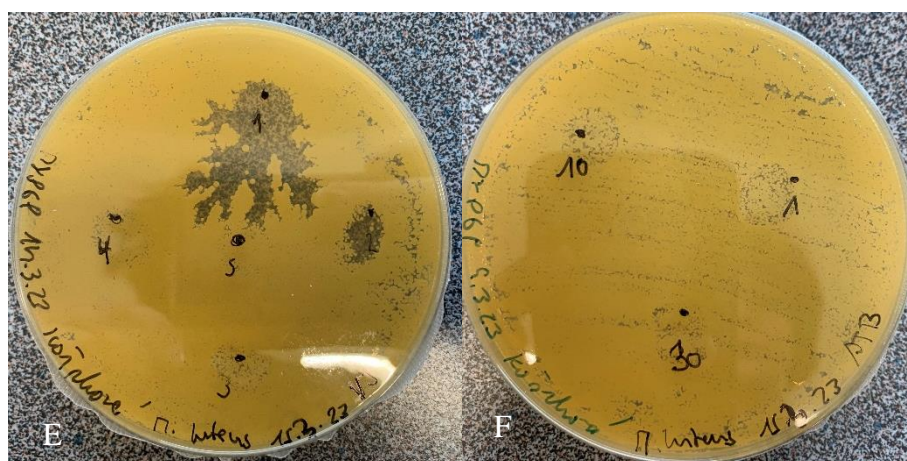
Obr. 10A, B: Porovnání antimikrobiálních účinků VJ vůči *M. luteus* CCM 732 (kultivace při 37 °C po dobu 48 hodin) při použití různých způsobů aplikace VJ; A, B: Aplikace 5 μ l testované látky pomocí papírových disků. A – VJ: 1 = 0,1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; 2 = 1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; 3 = 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; 4 = 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; 5 = 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. B – pozitivní kontrola bakteriálního růstu: 5 μ l CHL, koncentrace 30 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; 1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Při aplikaci VJ a CHL do jamek vykrojených v agarové plotně sterilním korkovrtem také nebyly u nárůstu bakteriálních kolonií *M. luteus* pozorovány žádné inhibiční zóny, což bylo možná způsobeno nedostatečným množstvím látky aplikovaným do jamky, které se mohlo částečně odpařit či zaschnout na povrchu misky, než difundovalo do média po jeho inokulaci příslušným mikroorganismem (Obr. 10C, D).



Obr. 10C, D: Porovnání antimikrobiálních účinků VJ vůči *M. luteus* CCM 732 (kultivace při 37 °C po dobu 48 hodin) při použití různých způsobů aplikace VJ: Aplikace testované látky do vykrojených jamek. C: 1 = 1 μ l ($c = 1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$); 2 = 2 μ l ($c = 1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$); 3 = 5 μ l ($c = 1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$); 4 = 10 μ l ($c = 1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$); 5 = 1 μ l ($c = 1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$); 6 = 10 μ l ($c = 1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$); D: pozitivní kontrola bakteriálního růstu – CHL: 1 = 5 μ l ($c = 30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$); 2 = 5 μ l ($c = 10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$); 3 = 5 μ l ($c = 1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$); 4 = 1 μ l ($c = 30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$); 5 = 1 μ l ($c = 10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$); 6 = 1 μ l ($c = 1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)

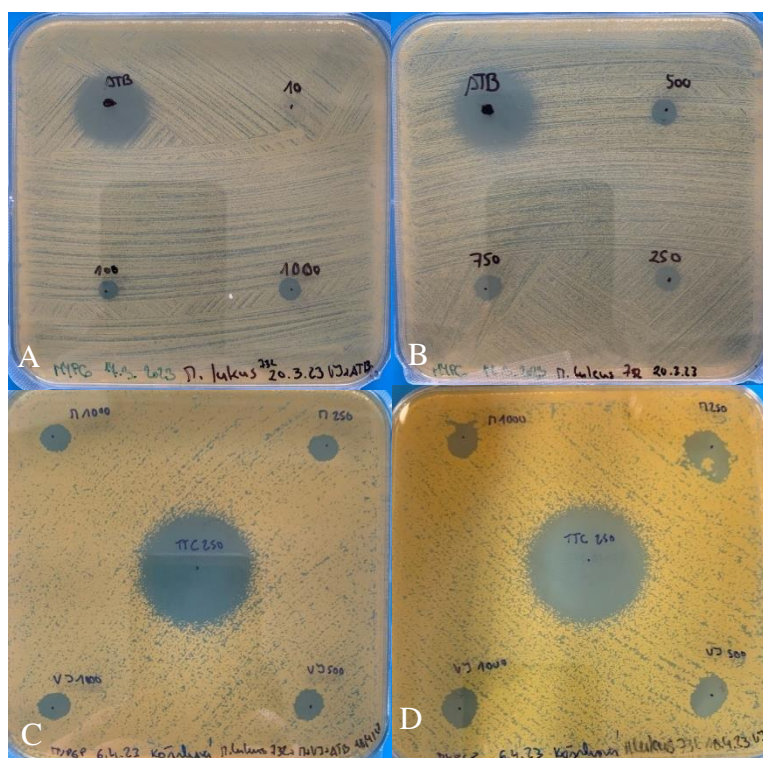
Po aplikaci VJ přímo na misku v podobě kapky a jejím vsáknutí byly pro *M. luteus* pozorované viditelné inhibiční zóny, ovšem zvolená koncentrace pozitivní kontroly antimikrobiálního účinku v podobě antibiotika CHL nevyhovovala (Obr. 10F), ačkoliv v řadě studií byla tato koncentrace CHL pro limitaci G^+ bakterií pozorována (Pai et al., 2010; Čivljak et al., 2013) Pro následující testy se všemi studovanými mikroorganismy byla zvolena přímá aplikace VJ, melittinu i kontrolního antibiotika v podobě kapky (o objemu 5 μ l) na agarovou plotnu po její inokulaci vybraným MO.



Obr. 10E, F: Porovnání antimikrobiálních účinků VJ vůči *M. luteus* CCM 732 (kultivace při 37 °C po dobu 48 hodin) při použití různých způsobů aplikace VJ – aplikace 5 μ l testované látky přímo na misku. E: VJ: 1 = 1000 μ g·ml⁻¹; 2 = 100 μ g·ml⁻¹; 3 = 10 μ g·ml⁻¹; 4 = 1 μ g·ml⁻¹; 5 = 0,1 μ g·ml⁻¹. F: pozitivní kontrola bakteriálního růstu: CHL, koncentrace 30 μ g·ml⁻¹; 10 μ g·ml⁻¹; 1 μ g·ml⁻¹

4.2.1.1 Difúzní testy včelího jedu a melittinu vůči *M. luteus* CCM 732

Podle Maitip et al., 2021 VJ vykazuje prokazatelné antimikrobiální účinky proti G^+ bakteriím. To bylo potvrzeno i během testování antimikrobiálních účinků VJ a melittinu na *M. luteus* CCM 732 (Obr.11). Ukázalo se, že z vybraného rozpětí koncentrací je VJ schopen vytvořit inhibiční zóny od koncentrace $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Obr. 11A). Kromě včelího jedu, což je komplexní směs látek, které mohou vykazovat antimikrobiální aktivitu (Wehbe et al., 2019), byly testovány i antimikrobiální účinky syntetického melittinu. Zatím nebyla provedena kvantifikace melittinu v použitém včelím jedu, a proto byly testovány antimikrobiální účinky syntetického melittinu aplikací dvou koncentrací ($250 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a $1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), ve kterých byl testován i včelí jed. Byla pozorována maximální velikost průměru inhibiční zóny při testování antimikrobiálních účinků VJ, a to 0,9 cm (Obr. 11C, D). Velikosti inhibičních zón pro všechny testované koncentrace VJ a melittinu jsou uvedeny v tabulce 7.



Obr. 10: Antimikrobiální účinky VJ a melittinu na *M. luteus* CCM 732. A) koncentrace VJ: $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; $1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, pozitivní kontrola bakteriálního růstu – $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ CHL, B) koncentrace VJ: $250 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $750 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; pozitivní kontrola bakteriálního růstu: $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ CHL; C, D) Antimikrobiální účinky VJ a melittinu na *M. luteus* CCM 732. Melittin: $c = 1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a $250 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; VJ: $c = 1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; pozitivní kontrola bakteriálního růstu: TTC o koncentraci $250 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$

Tab. 7 Inhibiční zóny včelího jedu a melittinu s *M. luteus* CCM 732

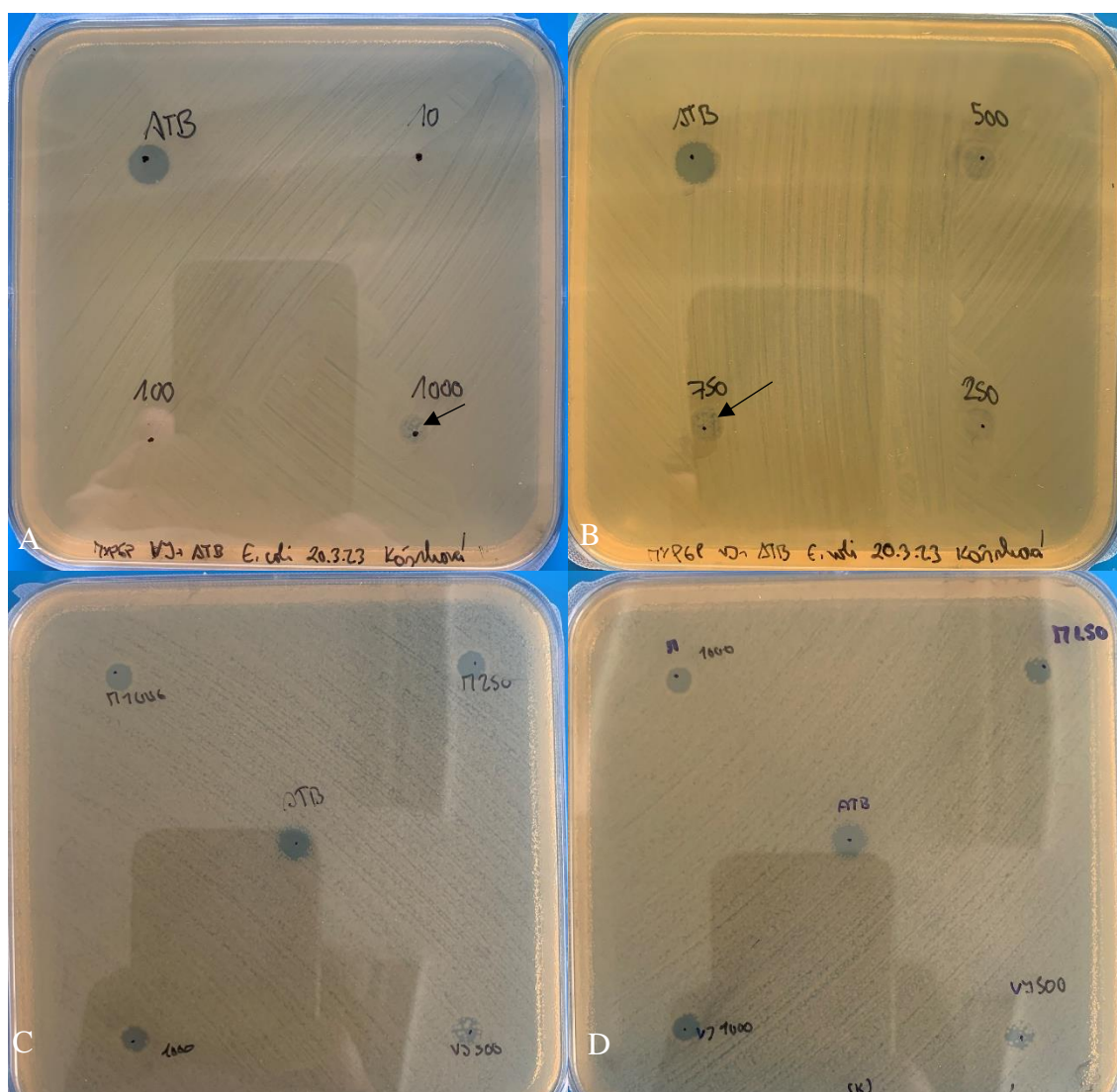
<i>M. luteus</i> CCM 732			
Látka	Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Výsledné aplikované množství [μg]	Průměr inhibiční zóny [cm]
Melittin	250	1,25	1,2
	1000	5	0,95
Včelí jed	10	0,05	0
	100	0,5	0,6
	250	1,25	0,7
	500	2,5	0,7
	750	3,75	0,8
	1000	5	0,85
CHL	500	2,5	2,4
TTC	250	1,25	5,5

Při porovnání inhibičních zón vzniklých aplikací VJ a melittinu (koncentrace $250 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a $1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) na agarové plotny inokulované *M. luteus* vidíme, že průměr inhibičních zón melittinu je větší než pro VJ. V případě aplikace VJ, který kromě melittinu obsahuje i jiné složky, bylo množství melittinu nižší. Kvantifikace melittinu v použitém VJ nebyla provedena, takže nevíme, jaké je konkrétní množství melittinu v použitém VJ. Je také třeba zohlednit fakt, že během aplikace VJ a melittinu nebo při zasychání došlo k naklonění misky, a tím k deformaci inhibičních zón (Obr. 11C, D). V publikovaných studiích byl doposud porovnáván antimikrobiální účinek VJ oproti melittinu v podobě MIC. Ve studii od Maitip et al., 2021 byla měření OD při vlnové délce 600 nm po dobu 24 hodin pomocí 96 jamkové mikrotitrační destičky určována minimální inhibiční koncentrace (MIC) VJ ($20.8 \pm 7.2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a melittinu ($25.0 \pm 0.0 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). V rámci této práce se s těmito koncentracemi nepracovalo, ovšem je patrné, že koncentrace VJ pod $20.8 \pm 7.2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (tj. i námi testovaná koncentrace VJ $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Obr. 11A)) není dostatečná k vytvoření inhibiční zóny, což odpovídá výsledkům studie od Maitip et al., 2021.

Během studie byla jako pozitivní kontrola použita dvě různá atb: CHL a TTC. Pro CHL byla po pilotních testech a srovnání s literaturou vybrána koncentrace $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. K volbě druhého atb vedla snaha o snížení použité koncentrace atb (TTC; $c = 250 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) (Fazlani et al., 2011), která byla úspěšná (Obr. 11C, D). Při porovnání antimikrobiálních účinků VJ i melittinu se zvolenými atb vidíme, že jsou inhibiční zóny v případě obou zvolených atb (CHL, TTC) výrazně větší než inhibiční zóny VJ i melittinu (Obr. 11).

4.2.1.2 Difúzní testy včelího jedu a melittinu vůči *E. coli* CCM 7395

E. coli jakožto G⁻ bakterie má nižší citlivost vůči včelímu jedu a melittinu, což je dáno lipopolysacharidovou vrstvou v buněčné stěně (El-Seedi et al., 2020). Během testování se potvrdilo, že na *E. coli* působí VJ až ve vysokých koncentracích, v případě testovaných koncentrací od 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, identicky tomu je v případě izolovaného melittinu (viz Obr. 12). Inhibiční zóny se zde jevily jako projasnění bakteriálního nárůstu. Jako pozitivní kontrola sloužil KAN o koncentraci 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.



Obr. 11: Antimikrobiální účinky VJ a melittinu na *E. coli* CCM 7395. A) koncentrace VJ: 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; pozitivní kontrola bakteriálního růstu – 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ KAN; B) koncentrace VJ: 250 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 750 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; pozitivní kontrola bakteriálního růstu – 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ KAN C, D) antimikrobiální účinky VJ a melittinu na *E. coli* CCM 7395; Melittin: c = 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a 250 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; VJ – c = 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; pozitivní kontrola bakteriálního růstu: KAN o koncentraci 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$

Tab. 8: Inhibiční zóny včelího jedu a melittinu s *E. coli* CCM 7395

<i>E. coli</i> CCM 7395			
Látka	Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Výsledné množství [μg]	Průměr Inhibiční zóny [cm]
Melittin	250	1,25	0.5
	1000	5	0.5
Včelí jed	10	0,05	0
	100	0,5	0
	250	1,25	0.5
	500	2,5	0.6
	750	3,75	0.6
	1000	5	0.5
KAN	500	2,5	0,8

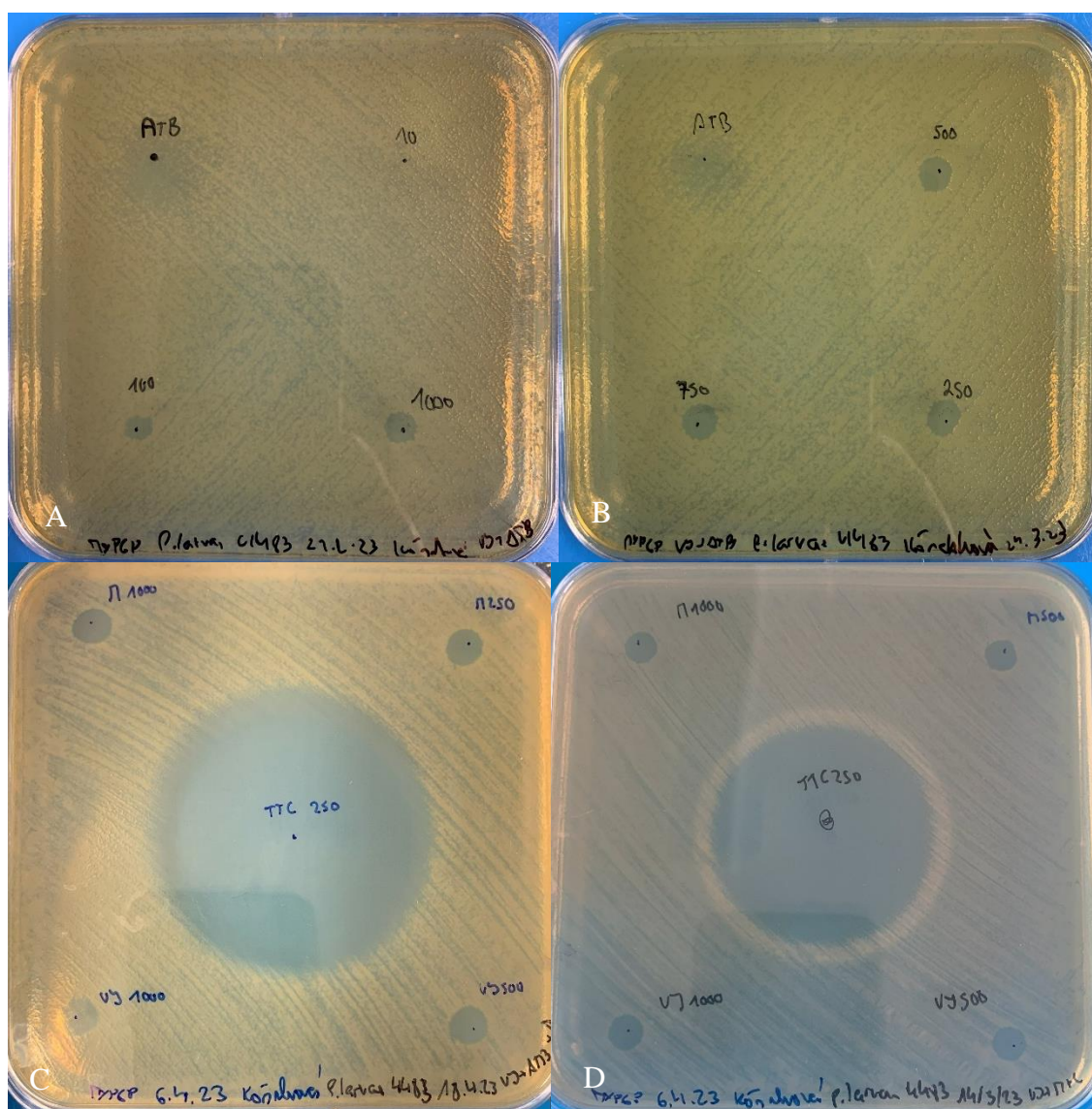
Ve studii od Zolfagharian et al., 2016 byl testován antimikrobiální účinek VJ na *E. coli* aplikací látky v podobě papírových disků. Výsledně aplikované množství VJ bylo 25 μg , 35 μg a 45 μg , což je výrazně více než bylo použito pro tuto práci. Velikosti inhibičních zón byly pro 25 μg $2,7 \pm 0,2$ cm; 35 μg $3,1 \pm 0,1$ cm a 45 μg $3,2 \pm 0,0$ cm, což je – vzhledem k množství aplikované látky na agarovou plotnu – více, než dosahují naše výsledky. Pro přesné porovnání s našimi výsledky by však bylo potřeba experiment zopakovat za stejných podmínek, tj. stejná metoda aplikace VJ a stejná koncentrace aplikované látky.

Při porovnání antimikrobiálních účinků VJ se syntetickým melittinem je patrné, že melittin pravděpodobně působí efektivněji. Zatímco při použití 250 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ i 1000 VJ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ dochází pouze k projasnění nárůstu, při použití stejných koncentrací melittinu nárůst není pozorovatelný. Velikosti inhibičních zón při použití těchto koncentrací jsou však srovnatelné. Jak již ale bylo zmíněno, melittin v používaném VJ nebyl kvantifikován a jeho konkrétní množství by bylo potřeba zanalyzovat.

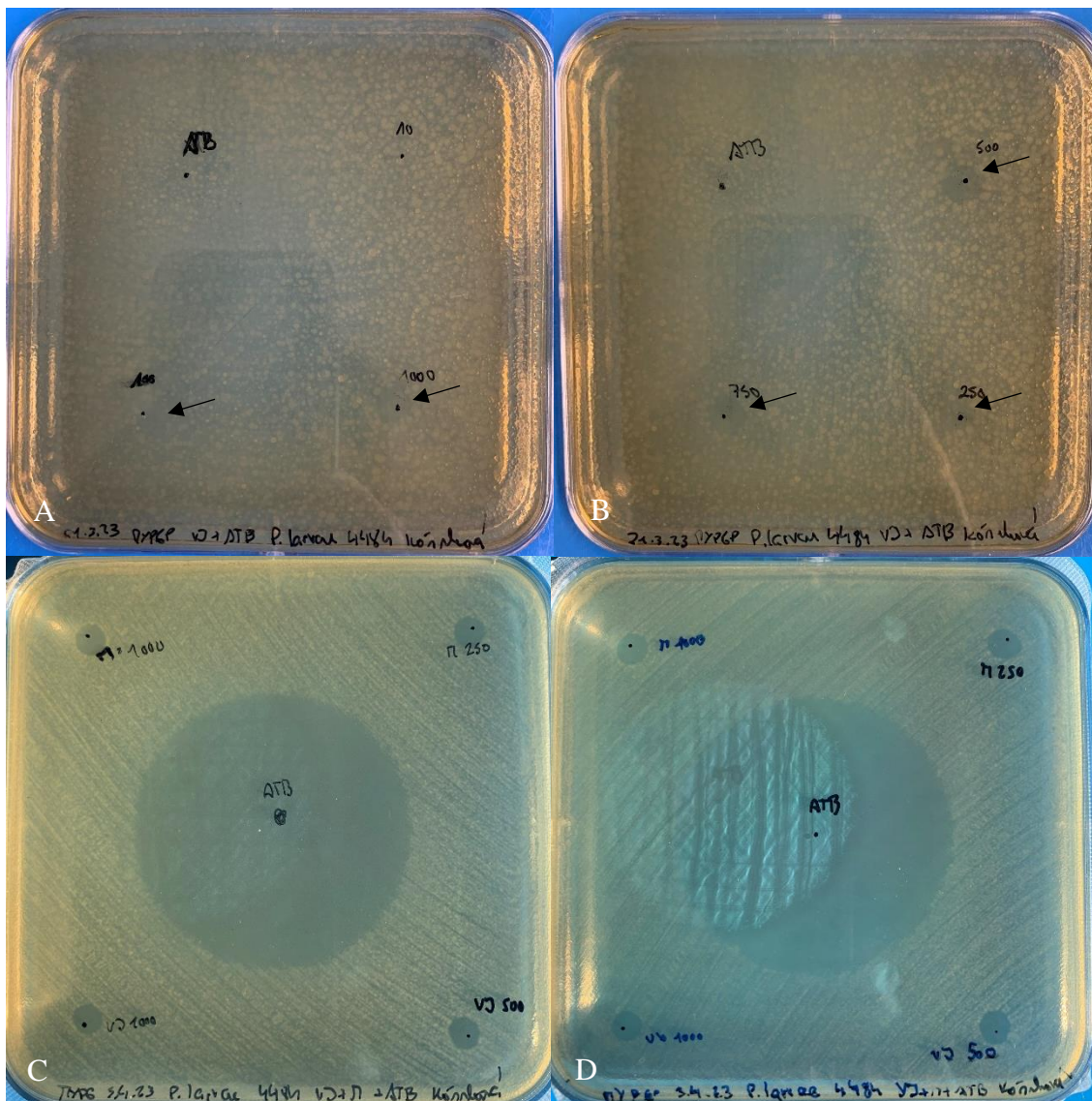
Při porovnání antimikrobiálních účinků při použití atb (KAN) a VJ nebo melittinu vidíme, že je inhibiční zóna KAN větší (0,8 cm oproti 0,6 cm pro VJ a 0,5 cm pro melittin). Zároveň vidíme, že použití VJ ve stejné koncentraci jako KAN (tj. 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) vede pouze k projasnění nárůstu, kdežto při použití KAN není nárůst pozorovatelný (Obr. 12B).

4.2.1.3 Difúzní testy včelího jedu a melittinu vůči *P. larvae* CCM 4483 a *P. larvae* CCM 4484

P. larvae je grampozitivní bakterie způsobující onemocnění mor včelího plodu (Tsourkas, 2020). V rámci práce byly rovněž testovány antimikrobiální účinky VJ a melittinu vůči tomuto včelímu patogenu. Během testování se potvrdilo, že oba kmeny *P. larvae*, tedy *P. larvae* CCM 4483 i *P. larvae* CCM 4484 vykazovaly značnou citlivost vůči VJ i jeho složce melittinu (Obr. 13). Inhibiční zóny jsou shrnuty v tabulce 9.



Obr. 12: Účinky VJ a melittinu na *P. larvae* CCM 4483; A) koncentrace VJ: 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; pozitivní kontrola – 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ CHL, B) koncentrace VJ: 250 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 750 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; pozitivní kontrola bakteriálního růstu: 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ CHL
C, D) účinky VJ a melittinu na *P. larvae* CCM 4483. Melittin – c = 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a 250 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; VJ – c = 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; pozitivní kontrola bakteriálního růstu: TTC o koncentraci 250 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$



Obr. 13: Antimikrobiální účinky VJ a melittinu na *P. larvae* CCM 4484. A) koncentrace VJ: $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; $1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; pozitivní kontrola bakteriálního růstu: $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ CHL; B) koncentrace VJ: $250 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $750 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; pozitivní kontrola bakteriálního růstu: $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ CHL

C, D) – antimikrobiální účinky VJ a melittinu na *P. larvae* CCM 4484; Melittin: $c = 1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a $250 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; VJ: $c = 1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; pozitivní kontrola bakteriálního růstu: TTC o koncentraci $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$

Tab. 9 Inhibiční zóny včelího jedu a melittinu s *P. larvae* CCM 4483 a *P. larvae* CCM 4484

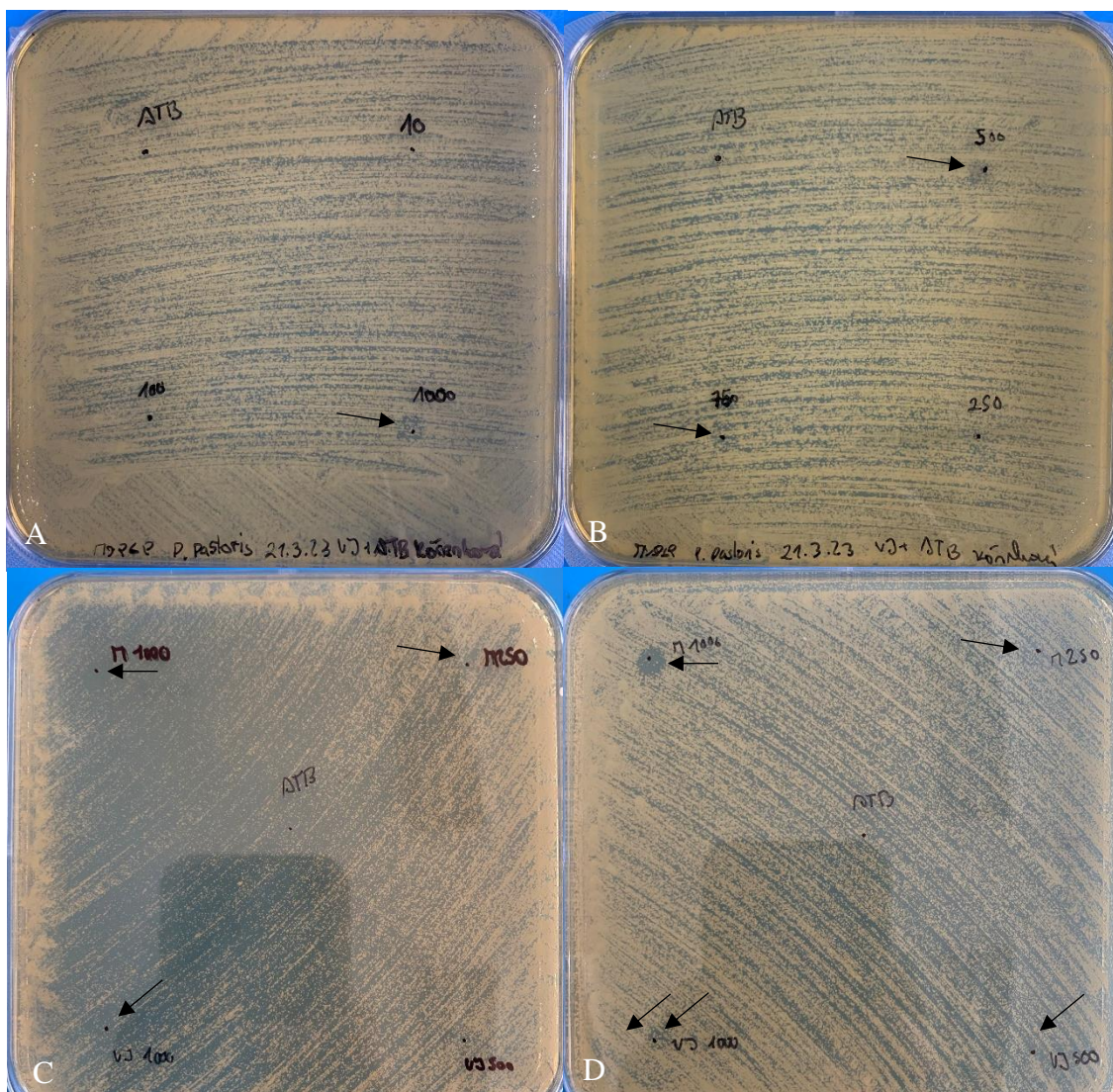
Látka	<i>P. larvae</i> CCM 4483			<i>P. larvae</i> CCM 4484		
	Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Výsledné aplikované množství [μg]	Průměr inhibiční zóny [cm]	Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Výsledné aplikované množství [μg]	Průměr inhibiční zóny [cm]
Melittin	250	1,25	0.6	250	1.25	0.6
	1000	5	0.7	1000	5	0.7
Včelí jed	10	0,05	0	10	0,05	0
	100	0,5	0.5	100	0,5	0.4
	250	1,25	0.7	250	1,25	0.7
	500	2,5	0.7	500	2,5	0.7
	750	3,75	0.8	750	3,75	0.8
	1000	5	0.7	1000	5	0.8
	CHL	500	2.5	2	500	2.5
TTC	250	1.25	5.5	500	2.5	6

Antimikrobiální účinky VJ na *P. larvae* (kmeny *PL33*, *Ayacucho*, *Miramar*, *Estafeta*, *Cobo*) byly zkoumány v rámci studie od Fernández et al., 2014. Včelí jed byl aplikován k bakteriím do 96 jamkové mikrotitulační destičky a ty se potom nechaly inkubovat při 37 °C po dobu 48 hodin. Životnost bakterií byla stanovena pomocí resazurinu (Fernández et al., 2014). Rovněž byla stanovena MIC, ovšem její hodnoty se lišily v závislosti na bakteriálním kmenu (MIC = 3.12 - 8.33 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).

V rámci této práce opět byla použita dvě různá antibiotika jako pozitivní kontrola bakteriálního růstu (CHL a TTC). Pro oba kmeny *P. larvae* (*P. larvae* CCM 4483 i *P. larvae* CCM 4484) byl použit CHL o koncentraci 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. V obou případech je špatně rozeznatelná zóna inhibice, a proto byl jako pozitivní kontrola bakteriálního růstu pro další experimenty použit TTC (Isidorov et al., 2018). Ve studii od Isidorov et al., 2018 používali 30 μg TTC a velikost inhibiční zóny pro *P. larvae* (kmeny *KB25*, *KB35*, *KB41*, *KB55*) byla větší, než 4 cm. Jako první byl v rámci práce použit TTC v koncentraci 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, tzn. celkové množství aplikované látky bylo 2,5 μg . Přesto však byla velikost inhibiční zóny pro *P. larvae* CCM 4484 rovna 6 cm. Proto byl pro následující experiment s *P. larvae* CCM 4483 použit TTC o koncentraci 250 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, tzn. celkové množství aplikované látky bylo 1,25 μg . Velikost inhibiční zóny je v tomto případě rovna 5,5 cm.

4.2.1.4 Difúzní testy včelího jedu a melittinu vůči *P. pastoris* CCM X-33

Při testování antimikrobiálních účinků VJ a melittinu na kvasinku *P. pastoris* CCM X-33 bylo patrné, ani velmi koncentrovaný VJ i melittin nemají na mikrobiální růst kvasinky výrazný vliv. I při tak vysokých koncentracích VJ a melittinu byl patrný mikrobiální nárůst v oblasti inhibičních zón, které byly v podobě slabšího nárůstu kvasinky. Slabší nárůst je pozorovatelný při koncentraci antimikrobiální látky (melittinu i VJ) $1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Obr. 15). Inhibiční zóny jsou shrnuty v tabulce 10.



Obr. 14: Antimikrobiální účinky VJ a melittinu na *P. pastoris* CCM X-33. A) koncentrace VJ: $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; $1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; pozitivní kontrola bakteriálního růstu: $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ CHL; B) koncentrace VJ: $250 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; $750 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; pozitivní kontrola bakteriálního růstu: $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ CHL C, D) Antimikrobiální účinky VJ a melittinu na *P. pastoris* CCM X-33. Melittin: $c = 1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a $250 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; VJ: $c = 1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; pozitivní kontrola bakteriálního růstu: TTC o koncentraci $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$

Tab. 10: Inhibiční zóny včelího jedu a melittinu (*P. pastoris* CCM X-33)

<i>P. pastoris</i> CCM X-33			
Látka	Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Výsledné aplikované množství [μg]	Průměr inhibiční zóny [cm]
Melittin	250	1,25	0
	1000	5	0,65
Včelí jed	10	0,05	0
	100	0,5	0
	250	1,25	0
	500	2,5	0
	750	3,75	0,6
	1000	5	0,6
CHL	500	2,5	0
TTC	500	2,5	0

Z výsledků je patrné, že VJ a melittin nemají na mikrobiální růst kvasinky *P. pastoris* CCM X-33 výrazný vliv. Inhibiční zóny se projevují jen jako slabší nárůst MO v oblasti aplikace antimikrobiální látky (koncentrace VJ 750 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; koncentrace melittinu 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Podle Haon et al., 2015 nemají na mikrobiální růst *P. pastoris* vliv ani konvenční atb (např. TTC, CHL). Při tomto experimentu byl využit CHL i TTC jako pozitivní kontrola mikrobiálního růstu. Jako první byl použit CHL, ovšem ten na kvasinku neměl antimikrobiální účinek a inhibiční zóna nebyla pozorovatelná ani v podobě slabšího nárůstu. Proto byl zvolen TTC, který však rovněž neměl na kvasinku antimikrobiální účinek. Vhodnou pozitivní kontrolou by byla látka s antimykotickým účinkem, například Fluconazol (Wall & Lopez-Ribot, 2020).

4.2.1.5 Porovnání difúzních testů

Přímou aplikací VJ a melittinu byly porovnány antimikrobiální účinky vůči G^+ bakteriím (*M. luteus*, *P. larvae*), G^- bakterii (*E. coli*) a kvasince (*P. pastoris*). Z výsledků vyplývá, že VJ a jeho majoritní složka melittin mají na bakterie mnohem výraznější antimikrobiální účinek než na kvasinku – alespoň na vybraných MO. Inhibiční zóny v případě *P. pastoris* CCM X-33 byly patrné až při vysokých koncentracích (tj. $1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) melittinu i VJ. Na kvasinkou inokulovaných agarových plotnách jsou po aplikaci VJ či melittinu pozorovány inhibiční zóny jako méně výrazný mikrobiální nárůst v místech aplikace antimikrobiální látky, a to při jejich koncentracích $1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Obr. 15).

Při porovnání antimikrobiálních účinků VJ či melittinu na testované zástupce bakterií se potvrzuje, že melittin a VJ reagují na G^+ bakterie výrazněji než G^- bakterie, jak zmiňují El-Seedi et al., 2020. Inhibiční zóny u G^- *E. coli* se při použití nižších koncentrací VJ (tj. $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $250 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) jeví jako slabší mikrobiálního nárůst (Obr. 12).

Při porovnání antimikrobiálních účinků VJ a melittinu na G^+ bakterie je pozorována podobná citlivost bakterií vůči izolované složce melittinu i komplexní směsi VJ. Při použití koncentrovaného melittinu, což je majoritní složka VJ, která je z velké části zodpovědná za antimikrobiální účinky VJ (Choi et al., 2015), nejvýrazněji reagoval z testovaných G^+ bakterií *M. luteus* CCM 732.

Porovnání velikostí inhibičních zón, které byly vytvořeny působením VJ na všechny mikroorganismy, ukázalo, že největšího průměru dosahovaly inhibiční zóny při vyšších koncentracích VJ (tj. $750 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a $1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), což pravděpodobně odpovídá dostatečnému množství složek VJ, které mají antimikrobiální účinky. Pro přehlednost jsou antimikrobiální účinky melittinu a VJ vůči všem testovaným MO v podobě inhibičních zón získaných difúzními testy komplexně shrnuty v tabulce 11.

Tab. 11 Porovnání velikostí inhibičních zón při různých koncentracích VJ a melittinu pro všechny testované mikroorganismy

Látka	Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Množství látky [μg]	Velikost inhibiční zóny [cm]				
			<i>M. luteus</i> CCM 732	<i>E. coli</i> CCM 7395	<i>P. larvae</i> CCM 4483	<i>P. larvae</i> CCM 4484	<i>P. pastoris</i> CCM X-33
Melittin	250	1,25	1,2	0,5	0,6	0,6	0
	1000	5	0,95	0,5	0,7	0,7	0,65
Včelí jed	10	0,05	0	0	0	0	0
	100	0,5	0,6	0	0,5	0,4	0
	250	1,25	0,7	0,5	0,7	0,7	0
	500	2,5	0,7	0,6	0,7	0,7	0
	750	3,75	0,8	0,6	0,8	0,8	0,6
	1000	5	0,85	0,5	0,7	0,8	0,6

4.2.2 Stanovení růstových křivek testovaných mikroorganismů v přítomnosti včelího jedu

Kromě testování antimikrobiální aktivity VJ pomocí difúzních testů byly pro všechny mikroorganismy stanoveny růstové křivky v závislosti na přítomnosti VJ. Testování probíhalo měřením optické hustoty mikrobiální suspenze při vlnové délce 600 nm po dobu 16 hodin od aplikace testované antimikrobiální látky. Stanovení růstové křivky probíhalo při 37 °C (tj. kultivační teplota pro *M. luteus* CCM 732, *P. larvae* CCM 4483, *P. larvae* CCM 4484 a *E. coli* CCM 7395), nebo při 30 °C (tj. kultivační teplota pro *P. pastoris* CCM X-33). I touto formou testování antimikrobiálních účinků VJ bylo potvrzeno, že je VJ schopen omezit růst některých z mikroorganismů. V rámci tohoto experimentu za zvolených podmínek bylo pozorováno, že v průběhu kultivace bakterií dochází k obnově bakteriálního růstu, zřejmě v důsledku vyčerpání VJ či jeho metabolizaci.

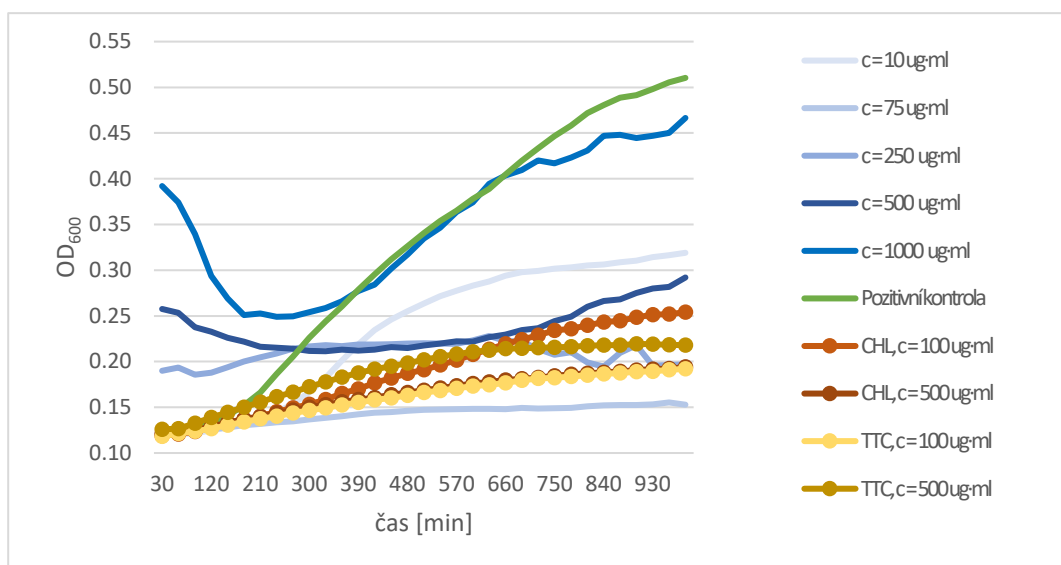
Během analýzy růstových křivek MO se naskytlo několik nesrovnalostí, např. vysoké hodnoty OD₆₀₀ na počátku experimentu při aplikaci včelího jedu o vyšších koncentracích (tj. od 500 µg·ml⁻¹). Ty následně postupně klesaly do určitého bodu (v časovém intervalu do 120.-300. minuty v závislosti na MO). Optická hustota pak začala opět narůstat. Pozorované počáteční hodnoty OD₆₀₀ zřejmě nesouvisí s obsahem buněčné kultury – jednak výchozí kultura byla naředěná na hodnotu OD₆₀₀ = 0,1, a dále touto spektrofotometrickou analýzou mikrobiálního růstu nelze stanovit usmrcení živých buněk (turbidita je tvořena podílem jak živých, tak mrtvých buněk) (Frébortová, 2008). Pokles v optické hustotě při 600 nm tedy není v důsledku změn mikrobiálního růstu. Naproti tomu nárůst OD₆₀₀, který se u většiny MO objevuje kolem 300 minuty, je pravděpodobně důsledkem obnovy růstu mikrobiální kultury.

Příčina vysokých počátečních hodnot OD₆₀₀ není objasněna, avšak s analýzou růstových křivek značně interferuje. Je možné, že ke změnám v OD₆₀₀ dochází rovněž v důsledku interakce mikrobiální kultura – komplexní směs VJ.

Pro přehlednost byly k vyhodnocení růstových křivek zvoleny pouze některé testované koncentrace VJ (10 µg·ml⁻¹; 75 µg·ml⁻¹; 250 µg·ml⁻¹; 500 µg·ml⁻¹ a 1000 µg·ml⁻¹).

4.2.2.1 Stanovení růstové křivky *M. luteus* CCM 732 v přítomnosti včelího jedu

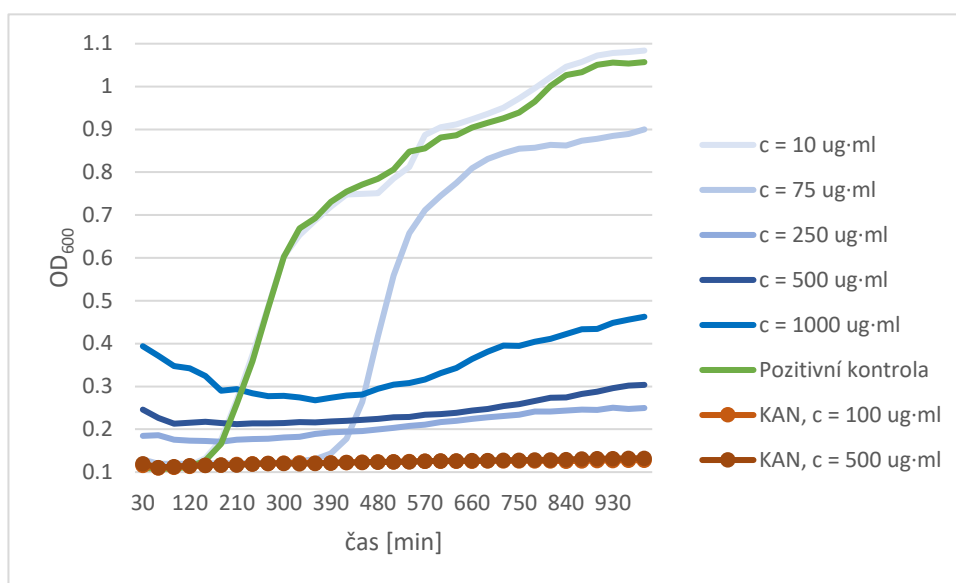
Podobně jako u difúzních testů, VJ efektivněji inhiboval růst G^+ bakterií oproti G^- bakterii *E. coli*. V případě *M. luteus* CCM 732 je vidět, že u bakteriální suspenze s aplikací VJ o koncentraci $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ dochází k minimální inhibici růstu (Obr. 16). Podobně jako u pozitivní kontroly brzy (v 210. minutě) nastává exponenciální fáze bakteriálního růstu, kdy bakterie roste, což odráží zvyšující se naměřené hodnoty OD_{600} . Zároveň se však projevuje efektivní inhibice u bakteriálních suspenzí s aplikací VJ o koncentracích $75 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a $250 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, kde není exponenciální fáze pozorovatelná. U bakteriálních suspenzí s aplikací VJ o koncentracích $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a $1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ dochází k poklesu naměřených hodnot OD_{600} od počátku experimentu do 210. minuty ($1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a 390. minuty ($500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Od této doby dochází ke zvyšování naměřených hodnot OD_{600} , tedy exponenciální fázi bakteriálního růstu. VJ je roztok s velice komplexním složením, jehož hlavní složky jsou peptidového charakteru (Carpena et al., 2020). Vzhledem k faktu, že jeho antimikrobiální aktivita úzce souvisí právě s peptidy a proteiny (Choi et al., 2015), předpokládáme, že mohlo dojít k jejich metabolizaci, interakci s dalšími složkami, ať už včelího jedu či mikrobiální kultury, až postupné degradaci, nebo vyčerpání VJ a pro efektivní inhibici bakteriálního růstu by byla potřeba jeho další aplikace. Jako negativní kontrola bakteriálního růstu pro tento experiment sloužila konvenční antibiotika CHL a TTC. Charakter růstových křivek *M. luteus* CCM 732 v přítomnosti VJ je zobrazen na Obr. 16.



Obr. 15: Růstová křivka *M. luteus* CCM 732 v přítomnosti včelího jedu. Testované koncentrace VJ v rozmezí od $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ do $1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, negativní kontrola bakteriálního růstu: CHL, TTC o koncentracích $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; pozitivní kontrola bakteriálního růstu: bakteriální suspenze (počáteční $\text{OD}_{600} = 0,1$). Stanovení probíhalo za kultivační teploty 37°C po dobu 16 hodin

4.2.2.2 Stanovení růstové křivky *E. coli* CCM 7395 v přítomnosti včelího jedu

Z růstových křivek bakteriální suspenze *E. coli* CCM 7395 v přítomnosti VJ o koncentraci $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a $75 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ je patrné, že nižší koncentrace VJ nejsou schopny růst *E. coli* CCM 7395 inhibovat. U naměřených hodnot OD_{600} pro bakteriální suspenze s aplikací VJ o koncentraci $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ je pozorovatelný nárůst počínající již ve 120. minutě, která odpovídá přechodu bakteriální kultury z lag fáze bakteriálního růstu do fáze exponenciální. Tyto naměřené hodnoty OD_{600} se shodují s naměřenými hodnotami OD_{600} pozitivní kontroly, což znamená, že mikrobiální růst *E. coli* CCM 7395 nebyl touto koncentrací VJ ovlivněn. Naměřené hodnoty OD_{600} pro bakteriální suspenze s aplikací VJ o koncentraci $75 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ naznačují, že do 390. minuty probíhá exponenciální fáze bakteriálního růstu a od tohoto momentu se naměřené hodnoty OD_{600} zvyšují. U bakteriální suspenze s aplikací VJ o koncentracích včelího jedu $250 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ nedochází ke značnému nárůstu naměřených hodnot OD_{600} . Při aplikaci VJ o koncentraci $1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ k bakteriální suspenzi opět dochází k poklesu naměřených hodnot OD_{600} až do 390. minuty – zmiňovanému artefaktu výše, a jejímu následnému plynulému nárůstu (Obr. 17). Negativní kontrola bakteriálního růstu pro tento experiment sloužilo konvenční atb KAN.

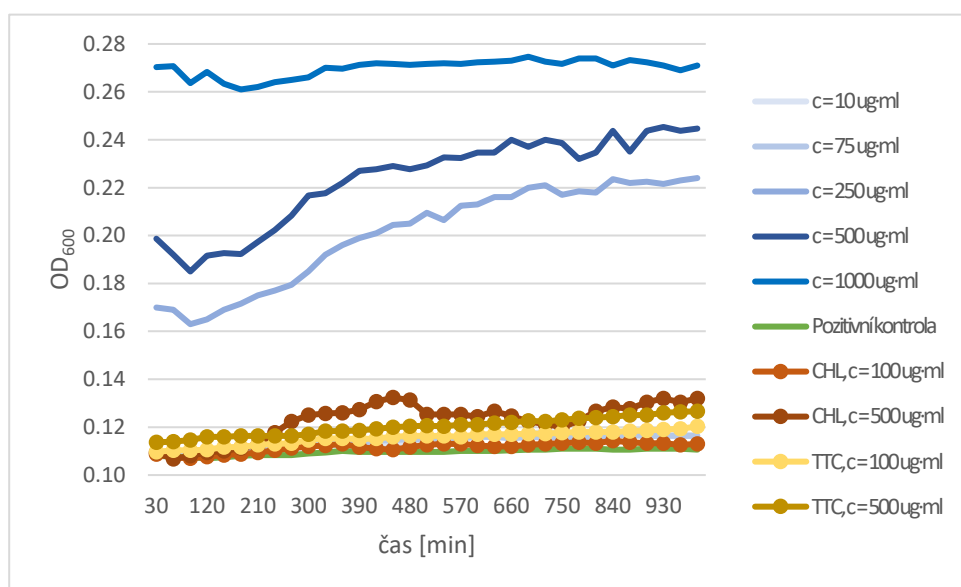


Obr. 16: Růstová křivka *E. coli* CCM 7395 v přítomnosti včelího jedu. Testované koncentrace VJ v rozmezí $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ – $1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; negativní kontrola bakteriálního růstu: KAN o koncentracích $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; pozitivní kontrola bakteriálního růstu: bakteriální suspenze (počáteční $\text{OD}_{600} = 0,1$). Stanovení probíhalo za kultivační teploty 37°C po dobu 16 hodin

4.2.2.3 Stanovení růstové křivky *P. larvae* CCM 4483 v přítomnosti včelího jedu

Získané růstové křivky *P. larvae* CCM 4483 (Obr. 18) naznačují, že VJ nemá na růst tohoto MO významný vliv. Naměřené hodnoty OD_{600} pro bakteriální suspenze s aplikací VJ o koncentraci $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a $75 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ se téměř shodují s naměřenými hodnotami OD_{600} pozitivní kontroly, což demonstruje, že růst *P. larvae* CCM 4483 nebyl aplikací VJ v těchto koncentracích ovlivněn. Naměřené hodnoty OD_{600} pro bakteriální suspenze s aplikací VJ o koncentracích $250 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ jsou již na počátku experimentu vyšší a dochází zde k jejich poklesu (do 120. minuty). Od této doby dochází u naměřených hodnot OD_{600} pro bakteriální suspenze po aplikaci VJ o koncentracích $250 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ k vzrůstu do 840. minuty, ovšem naměřené hodnoty OD_{600} pak narůstat přestávají. Při aplikaci VJ o koncentraci $1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ k bakteriální suspenzi je naměřená hodnota OD_{600} nejvyšší, ale nedochází k jejím změnám. Nicméně v případě kultur s aplikací nejvyšších koncentrací VJ (tj. $250 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ – $1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) vidíme změny v naměřené OD_{600} ne v důsledku bakteriálního růstu, ale v neznámých interakcích (pravděpodobně vlivem metabolizace až degradace složek VJ nebo vlivem interakcí složek VJ mezi sebou či se složkou bakteriální suspenze). *P. larvae* CCM 483 pro svůj

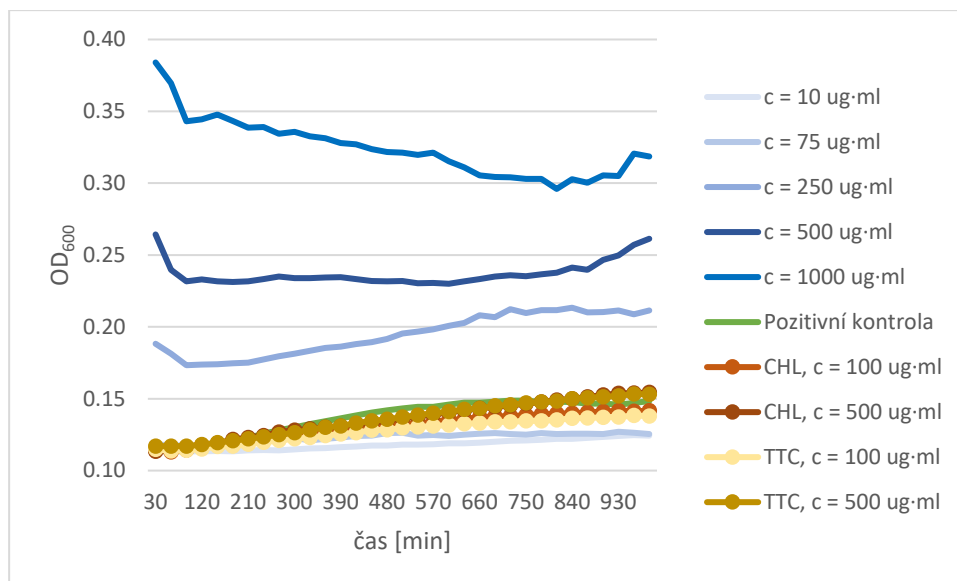
růst potřebuje ideálně 72 hodin, lze si povšimnout, že i růstová křivka pozitivní kontroly se prakticky nemění, což demonstruje, že v daném časovém intervalu probíhala zřejmě pouze lag fáze bakteriálního růstu; pro bakterii nebyly v tomto časovém intervalu dosaženy ideální podmínky pro její růst. Experiment by bylo tedy potřeba zopakovat, a to za pozměněného časového layoutu. Jako negativní kontrola bakteriálního růstu sloužila konvenční atb CHL a TTC.



Obr. 17: Růstová křivka *P. larvae* CCM 4483 v přítomnosti včelího jedu. Testované koncentrace VJ v rozmezí od $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ do $1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, negativní kontrola bakteriálního růstu: CHL, TTC o koncentracích $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; pozitivní kontrola bakteriálního růstu: bakteriální suspenze (počáteční $\text{OD}_{600} = 0,1$). Stanovení probíhalo za kultivační teploty 37°C po dobu 16 hodin

4.2.2.4 Stanovení růstové křivky *P. larvae* CCM 4484 v přítomnosti včelího jedu

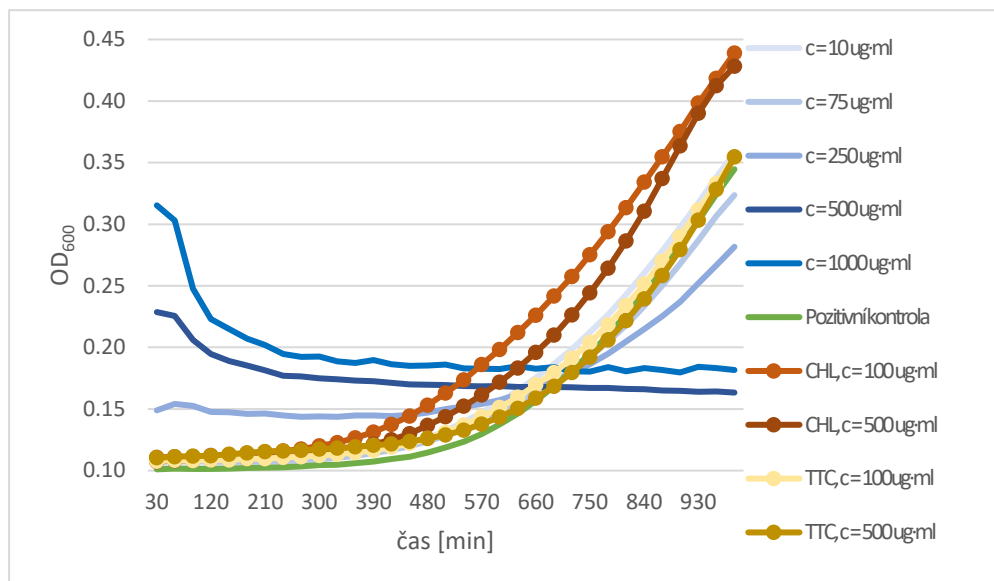
Situace s *P. larvae* CCM 4484 je velmi podobná *P. larvae* CCM 4483 (Obr. 18 19), kdy během experimentu dochází k pouze nepatrným změnám v naměřených hodnotách OD₆₀₀ pro bakteriální suspenze s aplikací VJ o koncentracích 10 µg·ml⁻¹ a 75 µg·ml⁻¹. U naměřených hodnot OD₆₀₀ na počátku experimentu pro bakteriální suspenze po aplikaci VJ o koncentraci 250 µg·ml⁻¹ je již vidět pokles (do 120. minuty). Následně u naměřených hodnot OD₆₀₀ pro tuto suspenzi pozorujeme pozvolný vzrůst, což by mohlo odpovídat exponenciální fázi bakteriálního růstu. Kolem 660. minuty však růst naměřených hodnot OD₆₀₀ přestává a OD₆₀₀ dále svou hodnotu významně nemění. U naměřených hodnot OD₆₀₀ pro bakteriální suspenzi s aplikací VJ o koncentraci 500 µg·ml⁻¹ je pozorován pokles už do 90. minuty, kde však končí. U této suspenze se hodnoty OD₆₀₀ od 90. minuty až do 840. minuty výrazně nemění, ovšem od 840. minuty opět pozorujeme nárůst naměřených hodnot OD₆₀₀. U bakteriální suspenze s aplikací VJ o koncentraci 1000 µg·ml⁻¹ opět dochází k poklesu naměřených hodnot OD₆₀₀ na počátku experimentu, ovšem v případě *P. larvae* CCM 4484 oproti *P. larvae* CCM 4483 je výrazný pokles hodnot OD₆₀₀ pouze do cca 120. minuty. Následně hodnoty OD₆₀₀ klesají mírněji. Jak již bylo zmíněno, pokles hodnot OD₆₀₀ pro některé koncentrace VJ (tj. 250 µg·ml⁻¹; 500 µg·ml⁻¹ a 1000 µg·ml⁻¹) na počátku experimentu je přisuzován neznámým interakcím. K nárůstu naměřených hodnot OD₆₀₀ pro bakteriální suspenzi s aplikací VJ o koncentraci 1000 µg·ml⁻¹ opět dochází až v 840. minutě, kdy pravděpodobně začíná exponenciální fáze a bakterie roste. Tento fakt se dá rovněž přisoudit ideálním podmínkám mikrobiálního růstu *P. larvae* CCM 4484, kdy exponenciální fáze – vzhledem k době kultivace 72 hodin, podobně jako *P. larvae* CCM 4483 – nastává mimo daný časový interval. Stejně jako u *P. larvae* CCM 4483 se růstová křivka pozitivní kontroly prakticky nemění, takže v tomto časovém intervalu nebylo dosaženo ideálních podmínek pro bakteriální růst. Experiment by bylo potřeba zopakovat za pozměněného časového layoutu. Jako negativní kontrola bakteriálního růstu sloužil CHL a TTC. Charakter růstových křivek *P. larvae* CCM 4484 v přítomnosti VJ je zobrazen na Obr. 19.



Obr. 18 Růstová křivka *P. larvae* CCM 4484 v přítomnosti včelího jedu. Testované koncentrace VJ v rozmezí od $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ do $1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, negativní kontrola bakteriálního růstu: CHL, TTC o koncentracích $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; pozitivní kontrola bakteriálního růstu: bakteriální suspenze (počáteční $\text{OD}_{600} = 0,1$). Stanovení probíhalo za kultivační teploty 37°C po dobu 16 hodin

4.2.2.5 Stanovení růstové křivky *P. pastoris* CCM X-33 v přítomnosti včelího jedu

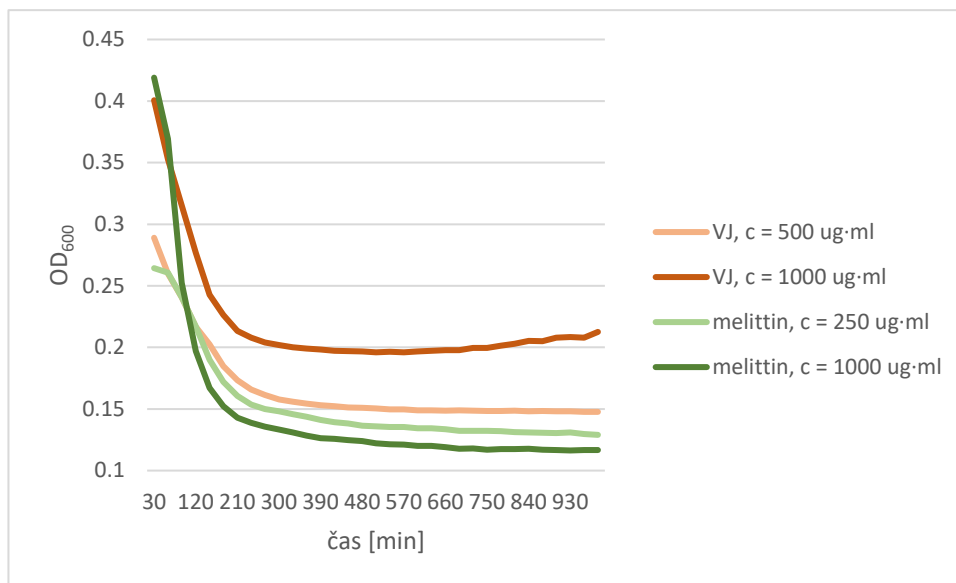
Nižší koncentrace VJ, tj. $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $75 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a $250 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ dle výsledků experimentu nejsou schopny růst *P. pastoris* CCM X-33 inhibovat. U všech těchto koncentrací dochází k téměř lineárnímu vzrůstu naměřených hodnot OD_{600} kolem 480. minuty, kdy nastává exponenciální fáze bakteriálního růstu, při níž kvasinka významně roste. Podobně je tak u negativní kontroly, což nebylo očekáváno a tento výsledek vypovídá o nevhodně použitém atb (CHL i TTC). Na kontrolu růstu kvasinek se běžně používají antimykotika, avšak pro zvolená atb byl negativní účinek proti kvasinkám rovněž popsán (Haon et al., 2015). Podobně jako tomu bylo u jiných MO, byl pozorován pokles počáteční naměřené hodnoty OD_{600} u mikrobiálních suspenzí po aplikaci VJ o koncentracích $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a $1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ v důsledku neznámých interakcí. (pravděpodobně vlivem metabolizace až degradace složek VJ nebo vlivem interakcí složek VJ mezi sebou či se složkou bakteriální suspenze). Kolem 210. minuty přestávají klesat naměřené hodnoty OD_{600} obou suspenzí (s aplikací VJ o koncentraci $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ i $1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). U obou suspenzí již překvapivě nedochází k dalšímu nárůstu naměřených hodnot OD_{600} , což zřejmě odráží, že kvasinka nebyla schopna růstu (Obr. 20). Jako negativní kontrola bakteriálního růstu sloužila konvenční atb CHL a TTC.



Obr. 19: Růstová křivka *P. pastoris* CCM X-33 v přítomnosti včelího jedu. Testované koncentrace VJ v rozmezí od $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ do $1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, negativní kontrola bakteriálního růstu: CHL, TTC o koncentracích $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; pozitivní kontrola bakteriálního růstu: bakteriální suspenze (počáteční $\text{OD}_{600} = 0,1$). Stanovení probíhalo za kultivační teploty $30 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 16 hodin

4.2.2.6 Analýza spektrálních vlastností včelího jedu a melittinu v čase

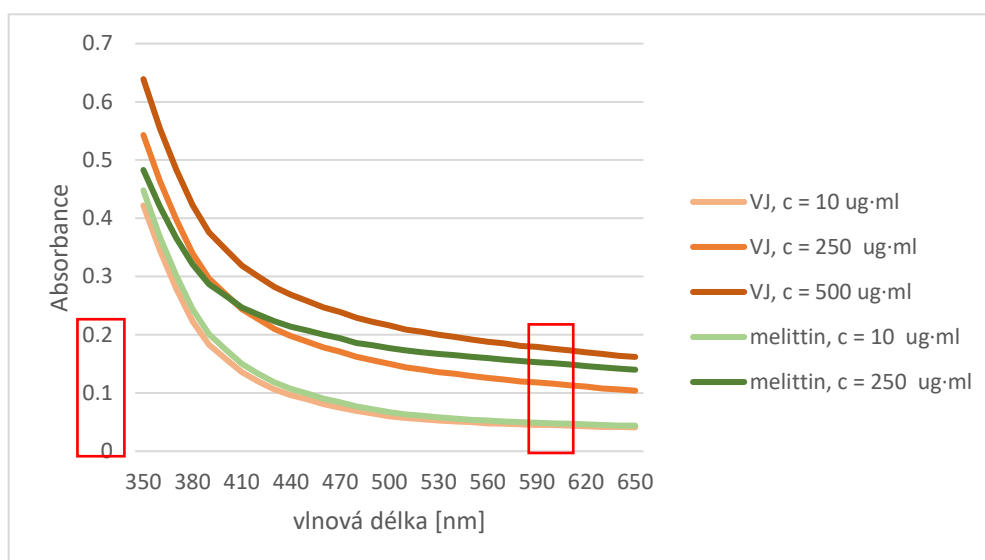
Zvýšené hodnoty OD_{600} a jejich pokles, který není vzhledem k analýze touto metodikou možný, u mikrobiálních kultur s aplikací VJ o vyšší koncentraci (tj. $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) značí o interferenci v rámci zvolené metodiky pro analýzu ovlivnění mikrobiálního růstu vybraných MO včelím jedom. Tato interference může být v důsledku strukturních změn složek VJ nebo jejich interakcí, ať už s jinými složkami VJ či bakteriální suspenzí. Proto bylo testováno, zdali samotný včelí jed či melittin, bez přítomnosti mikrobiální kultury, rovněž vykazuje při analýze OD_{600} tyto charakteristiky (Obr. 21). Podle křivek se potvrzuje, že vyšší hodnoty OD_{600} na počátku experimentu a jejich postupný pokles v počáteční fázi růstových křivek (tj. lag fázi) je způsoben zřejmě samotnými látkami (VJ, melittin), a to zřejmě jejich metabolizací, nebo v případě VJ lze uvažovat i o potenciálních interakcích jednotlivých složek VJ po rozpuštění z lyofilizované podoby. Pro porovnání změny OD bakteriální suspenze v přítomnosti VJ s čistým VJ nebo melittinem bylo do jamek s $50 \mu\text{l}$ sterilního MYPGP aplikováno i $50 \mu\text{l}$ sterilního VJ ($c = 500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a melittinu ($c = 250 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Z grafu je patrné, že se hodnoty OD_{600} VJ a melittinu na počátku experimentu při stejné koncentraci (tj. $1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) nijak výrazně neliší. Naměřené hodnoty OD_{600} na počátku experimentu pro VJ o koncentraci $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a melittin o koncentraci $250 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ se také liší jen nepatrně navzdory rozdílné koncentraci. Dá se tedy usoudit, že jsou vysoké hodnoty OD_{600} na počátku experimentů způsobeny právě přítomností melittinu. Dále si můžeme povšimnout, že hodnoty OD_{600} pro melittin při $c = 1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ klesají výrazněji než pro VJ o $c = 1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, avšak důvod tohoto pozorovaného chování testovaných látek je za daných okolností neznámý.



Obr. 20: Graf závislosti změny OD₆₀₀ pro roztok VJ a melittinu v čase

4.2.2.7 Absorpční spektrum včelího jedu a melittinu

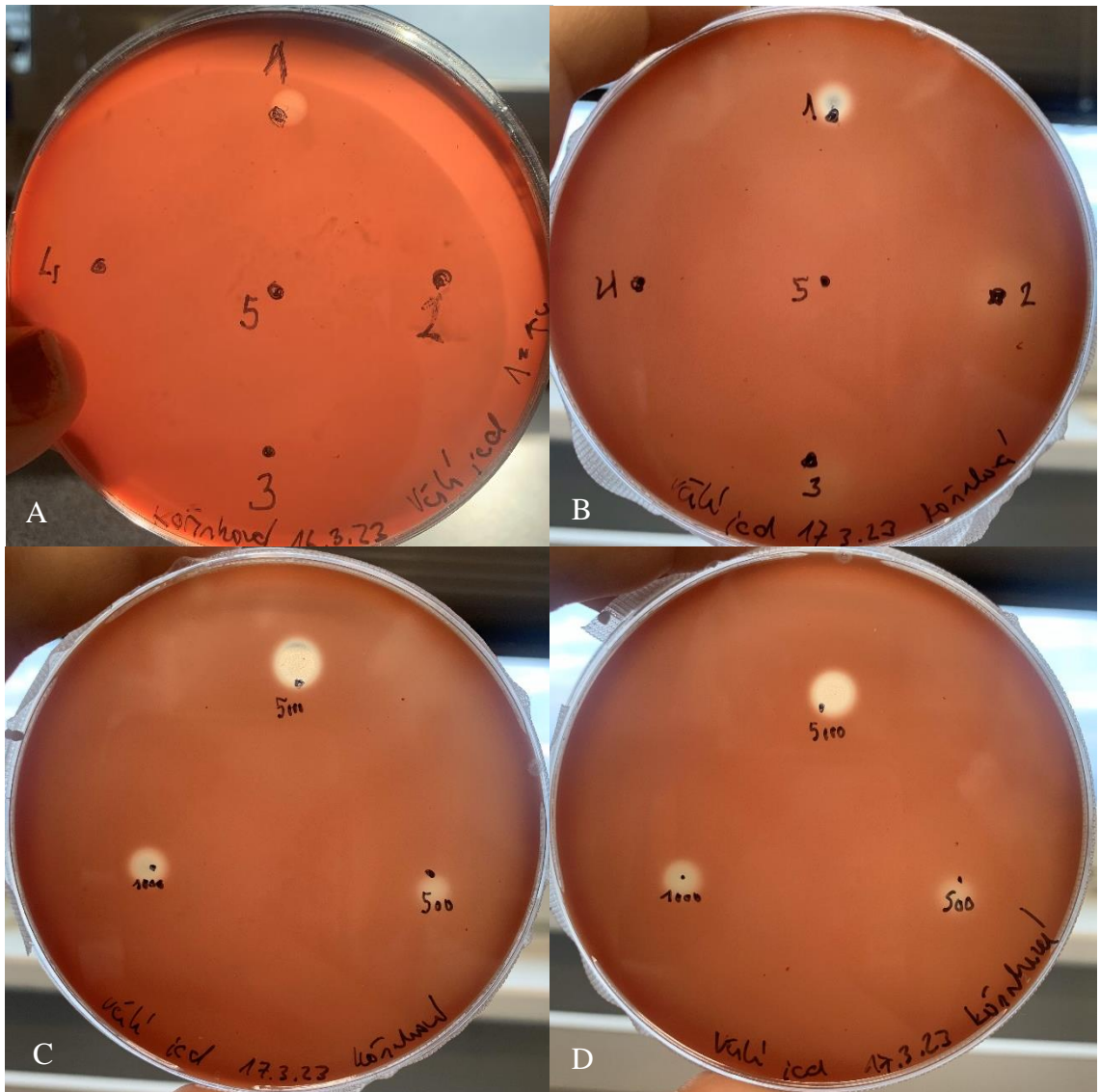
Pro potvrzení, zdali je naměřená vysoká hodnota OD₆₀₀ na začátku experimentů zapříčiněna pouze zákalem VJ/ melittinu, bylo proměřeno absorpční spektrum VJ a melittinu v rozsahu vlnových délek 350 nm – 650 nm (viz Obr. 22). Byly použity včelí jed o koncentracích 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; 250 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a melittin o koncentracích 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a 250 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Ze získaných absorpčních spekter je patrné, že VJ a melittin při těchto koncentracích mají maximální hodnotu absorpce při vlnové délce 600 nm maximálně 0,2. Při analýze růstových křivek mikrobiálních kultur ošetřených danými koncentracemi VJ/ melittinu měřením optické hustoty suspenze při vlnové délce 600 nm byly u hodnoty OD₆₀₀ na počátku experimentu podobné, což znamená, že vysoké hodnoty OD₆₀₀ byly zřejmě způsobeny právě VJ, respektive melittinem.



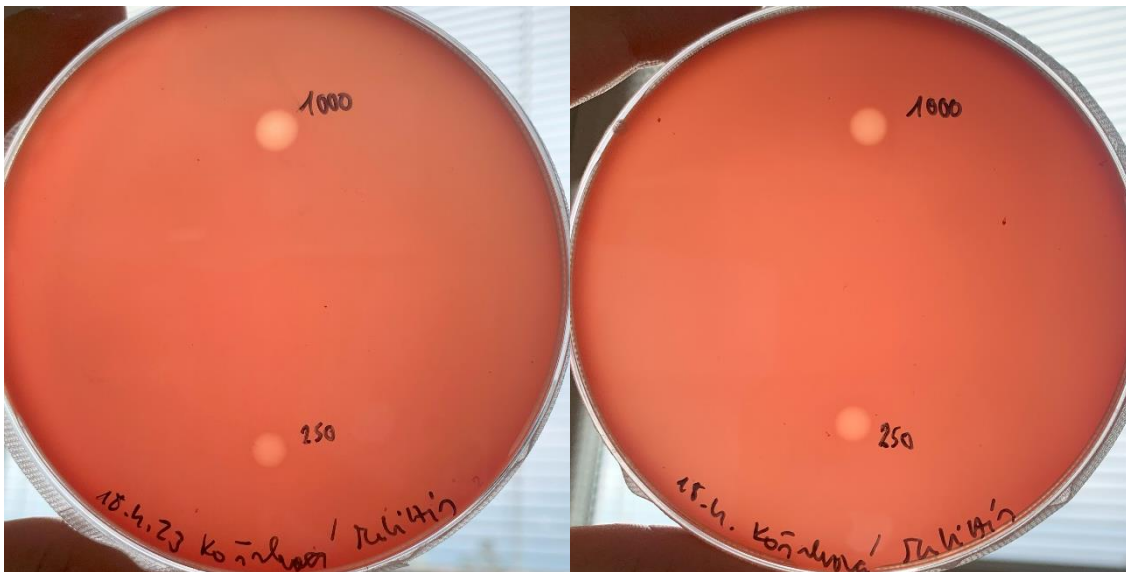
Obr. 21: Absorpční spektrum VJ ($c = 10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $250 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a melittinu ($c = 10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $250 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) v rozsahu vlnových délek 350 nm – 650 nm

4.3 Hemolytické účinky včelího jedu a melittinu

Jeden z nejdůležitějších peptidů VJ, melittin, vykazuje značnou cytotoxicitu, a to narušením biologické membrány (Carpena et al., 2020). Tato cytotoxicita je neselektivní, a proto je mimo jiné jak melittin, tak surový včelí jed schopen narušit membránu erytrocytů. To mu tedy dává výrazné hemolytické účinky. Tyto účinky byly v rámci experimentální části bakalářské práce testovány využitím komerčního krevního agaru (Dulab) (Obr. 23, 24) V obou případech se potvrdilo, že vyšší koncentrace syntetického melittinu a melittinu ve včelím jedu mají výrazné hemolytické účinky (tzn. VJ od $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, izolovaný melittin i $250 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), což komplikuje jeho využití pro terapeutické účely. Aby se tento účinek co nejvíce omezil a během terapie nebyla zasažena okolní tkáň, bylo by třeba aplikovanou formu melittinu modifikovat, například navázat na protilátku nebo vytvořit nosič, který by jej transportoval bez interakce se zdravou tkání (Moreno & Giralt, 2015). Ve včelím jedu se rovněž nachází bvPLA2, která je také schopna interagovat s biologickými membránami a narušit jejich strukturu, čímž také může působit cytotoxicky, respektive hemolyticky. U hemolytických účinků byla potvrzena synergie mezi bvPLA2 a melittinem. Pro terapeutické účely je v tomhle ohledu vhodné použít melittin purifikovaný od bvPLA2. (Watala & Kowalczyk, 1990; Wehbe et al., 2019).



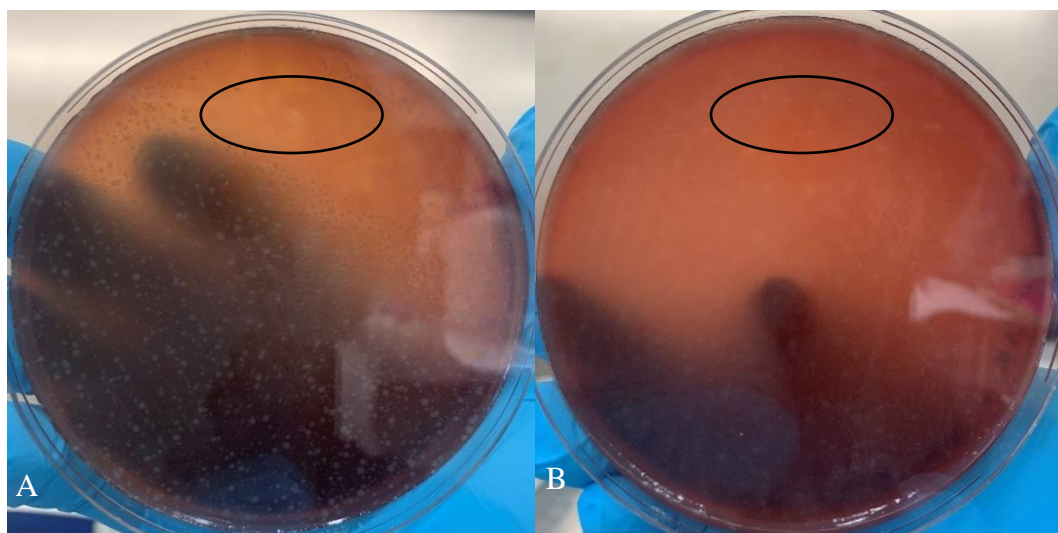
Obr. 22 Testování hemolytických účinků VJ na krevním agaru Columbia. Na agar bylo aplikováno 5 μl VJ testované koncentrace. A, B) koncentrace VJ: 1 = $1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 2 = $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 3 = $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 4 = $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 5 = $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. C, D) koncentrace VJ: $5000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$



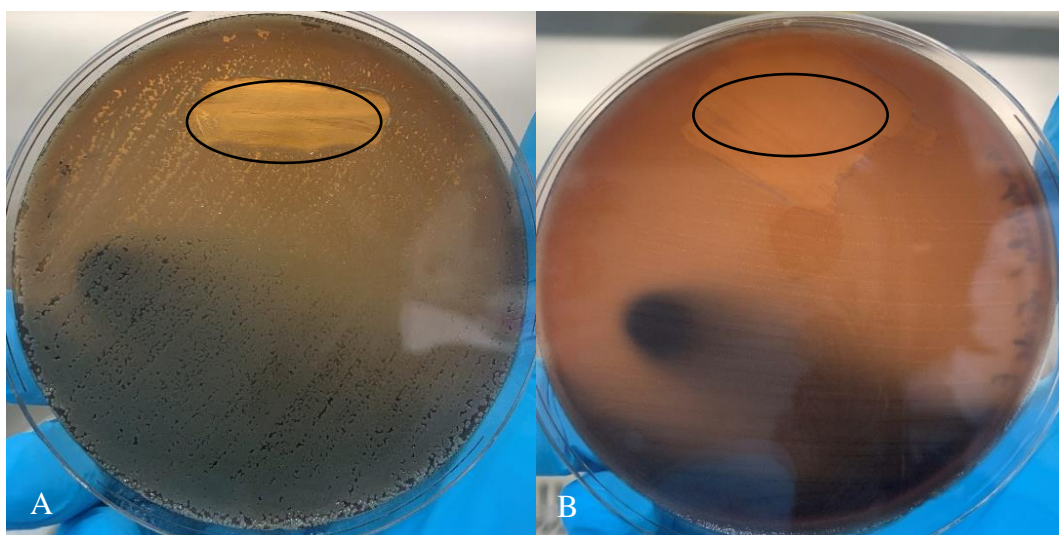
Obr. 23: Duplikát: Testování hemolytických účinků melittinu na krevním agaru Columbia. Na agar bylo aplikováno 5 μl melittinu o koncentracích $1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a $250 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$

4.4 Hemolytické účinky vybraných mikroorganismů

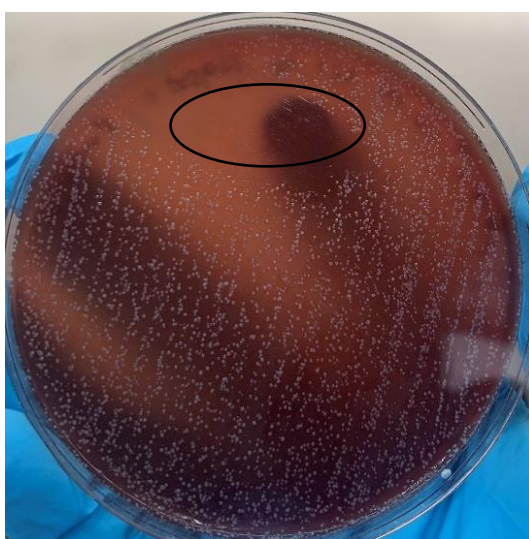
Pokud by měl být prokázán hemolytický účinek melittinu v rámci experimentu s MO, je nutné ověření, zdali samotný MO tyto účinky nemá. Během testování hemolytických účinků jednotlivých mikroorganismů, které byly pro tuto práci zvoleny, se ukázalo, že hemolytické účinky má *M. luteus* CCM 732, *P. larvae* CCM 4483, *P. larvae* CCM 4484 i *E. coli* CCM 7395, což se projevilo projasněním média celého, nebo pouze míst pod koloniemi. Oba kmeny *P. larvae*, tedy *P. larvae* CCM 4483 i *P. larvae* CCM 4484 způsobily projasnění agaru pouze pod samotnými koloniemi (Obr. 25A, 25B). Krevní agar s *M. luteus* CCM 732 byl po inkubování zcela žlutý (Obr. 26A). Podobně vypadal krevní agar s *E. coli* CCM 7395, ovšem tam nebyla změna barvy tak výrazná (Obr. 26B). Z toho vyplývá, že nelze hemolytické účinky pocházející pouze z VJ/ melittinu analyzovat v kombinaci s těmito mikroorganismy. U *P. pastoris* CCM X-33 hemolytické účinky nebyly prokázány (Obr. 27).



Obr. 245: Hemolytické účinky mikroorganismů. A – *P. larvae* CCM 4483, B – *P. larvae* CCM 4484



Obr. 26: Hemolytické účinky mikroorganismů: A - *M. luteus* CCM 732; B - *E. coli* CCM 7395



Obr. 27: Hemolytické účinky mikroorganismů – *P. pastoris* CCM X-33

5 Závěr

Bakalářská práce je primárně zaměřena na problematiku včelího jedu a jeho bioaktivních složek, včetně jejich využití v apiterapii. V počátku práce byla věnována pozornost obecné charakteristice včelích produktů, tedy nejen včelího jedu, a dále také krátkému seznámení s apiterapií. Poté následovala část věnována včelímu jedu a jeho složce melittinu, včetně metod izolace. Na konci teoretické části práce bylo shrnuto, jak je možné studovat antimikrobiální účinky látek.

Experimentální část práce byla především věnována studiu antimikrobiálních účinků včelího jedu a jeho majoritní složky, peptidu melittinu. Bylo dosaženo těchto dílčích výsledků:

1. Byly připraveny mikrobiální kultury (G^+ a G^- bakterie, kvasinka) vůči kterým byl testován antimikrobiální účinek včelího jedu, případně melittinu;
2. Bylo uskutečněno testování antimikrobiální aktivity včelího jedu a melittinu pomocí difúzních testů
 - Pro testování byly vybrány difúzní testy v uspořádání přímé aplikace včelího jedu/ melittinu přímo na agarovou plotnu s daným mikroorganismem
 - Testované mikroorganismy *M. luteus* CCM 732, *P. larvae* CCM 4483 a *P. larvae* CCM 4484 (zástupci G^+ bakterií) byly vůči účinkům včelího jedu/ melittinu citlivější v porovnání s *E. coli* CCM 7395 (G^- bakterie). Antimikrobiální účinky včelího jedu/ melittinu na kvasinku *P. pastoris* CCM X-33 byly patrné jen ve vysokých koncentracích;
3. V rámci testování antimikrobiální aktivity včelího jedu byly stanoveny růstové křivky testovaných mikroorganismů v přítomnosti včelího jedu. Podobně jako v případě testování antimikrobiální aktivity včelího jedu pomocí difúzních testů byl růst mikroorganismů inhibován především v případě G^+ bakterií;
4. S využitím krevního agaru byly prokázány hemolytické účinky včelího jedu a melittinu;
5. Rovněž byly prokázány hemolytické účinky *M. luteus* CCM 732, *P. larvae* CCM 4483, *P. larvae* CCM 4484 a *E. coli* CCM 7395

Tato práce tak přinesla pilotní výsledky pro testování antimikrobiálních účinků včelího jedu a jeho složky melittinu na pracovišti Katedry biochemie s potvrzením, že tyto účinky jsou efektivní především pro zástupce G^+ bakterií. Pro pokračování práce by bylo vhodné vybrat jiné spektrum právě G^+ bakterií, které nevykazují hemolytické účinky, a studovat

na nich antimikrobiální účinky včelího jedu a melittinu s potencionálem jejich využití pro případné apiterapeutické aplikace.

6 Literatura

Ahuja, V., & Ahuja, A. (2010). Apitherapy - A sweet approach to dental diseases - Part I : Honey. *Journal of Advanced Dental Research*, 1(1), 81-86.

Ahuja, V., & Ahuja, A. (2011). Apitherapy - A sweet approach to dental diseases. Part II: Propolis. *Journal of Advanced Oral Research*, 2(2), 1-8. <https://doi.org/10.1177/2229411220110201>

Albaridi, N. (2019). Antibacterial Potency of Honey. *International Journal of Microbiology*, 2019, 1-10. <https://doi.org/10.1155/2019/2464507>

Alekseeva, A., Volynsky, P., Krylov, N., Chernikov, V., Vodovozova, E., & Boldyrev, I. (2021). Phospholipase A2 way to hydrolysis: Dint formation, hydrophobic mismatch, and lipid exclusion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1863(1). <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183481>

Ali, M. (2012). Studies on Bee Venom and Its Medical Uses. *International Journal of Advancements in Research & Technology*, 1(2).

Bafna, J., Sans-Serramitjana, E., Acosta-Gutiérrez, S., Bodrenko, I., Hörömpöli, D., Berscheid, A., Brötz-Oesterhelt, H., Winterhalter, M., & Ceccarelli, M. (2020). Kanamycin Uptake into Escherichia coli Is Facilitated by OmpF and OmpC Porin Channels Located in the Outer Membrane. *ACS Infectious Diseases*, 6(7), 1855-1865. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.0c00102>

Bello, J., Bello, H., & Granados, E. (1982). Conformation and Aggregation of Melittin: Dependence on pH and Concentration. *Biochemistry*, 21, 461-465.

Beneš, J. (2021). *Stanovisko k alternativní medicíně*. Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně. Retrieved 2023-01-29, from <https://www.cls.cz/stanovisko-k-alternativni-medicine>

Birr, C., & Wengert-Müller, M. (1980). Molecular Perspectives of Synthetic Mast Cell-Degranelating Peptide. *Perspectives in Peptide Chemistry*, 372-380. <https://doi.org/10.1159/000392947>

Blank, S., Seismann, H., McIntyre, M., Ollert, M., Wolf, S., Bantleon, F., Spillner, E., & Rosenberg, H. (2013). Vitellogenins Are New High Molecular Weight Components and Allergens (Api m 12 and Ves v 6) of Apis mellifera and Vespula vulgaris Venom. *PLoS ONE*, 8(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062009>

Bogdanov, S. (2016). Biological and therapeutic properties of bee venom. *Bee Product Science*.

Bucekova, M., Jardekova, L., Juricova, V., Bugarova, V., Di Marco, G., Gismondi, A., Leonardi, D., Farkasovska, J., Godocikova, J., Laho, M., Klaudiny, J., Majtan, V., Canini, A., & Majtan, J. (2019). Antibacterial Activity of Different Blossom Honeys: New Findings. *Molecules*, 24(8). <https://doi.org/10.3390/molecules24081573>

Buku, A. (1999). Mast cell degranulating (MCD) peptide: a prototypic peptide in allergy and inflammation. *Peptides*, 20(3), 415-420. [https://doi.org/10.1016/S0196-9781\(98\)00167-3](https://doi.org/10.1016/S0196-9781(98)00167-3)

Buku, A., & Price, J. (2001). Further studies on the structural requirements for mast cell degranulating (MCD) peptide-mediated histamine release. *Peptides*, 22(12), 1987-1991. [https://doi.org/10.1016/S0196-9781\(01\)00538-1](https://doi.org/10.1016/S0196-9781(01)00538-1)

Burzyńska, M., & Piasecka-Kwiatkowska, D. (2021). A Review of Honeybee Venom Allergens and Allergenicity. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16). <https://doi.org/10.3390/ijms22168371>

Carpena, M., Nuñez-Estevez, B., Soria-Lopez, A., & Simal-Gandara, J. (2020). Bee Venom: An Updating Review of Its Bioactive Molecules and Its Health Applications. *Nutrients*, 12(11). <https://doi.org/10.3390/nu12113360>

- Carter, V., Underhill, A., Baber, I., Sylla, L., Baby, M., Larget-Thiery, I., Zettor, A., Bourguoin, C., Langel, Ü., Faye, I., Otvos, L., Wade, J., Coulibaly, M., Traore, S., Tripet, F., Eggleston, P., Hurd, H., & Schneider, D. (2013). Killer Bee Molecules: Antimicrobial Peptides as Effector Molecules to Target Sporogonic Stages of Plasmodium. *PLoS Pathogens*, 9(11). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003790>
- Ćirić, J., Haneklaus, N., Rajić, S., Baltić, T., Lazić, I., & Đorđević, V. (2022). Chemical composition of bee bread (perga), a functional food: A review. *Journal of Trace Elements and Minerals*, 2. <https://doi.org/10.1016/j.jtemin.2022.100038>
- Collazo, N., Carpena, M., Nuñez-Estevez, B., Otero, P., Simal-Gandara, J., & Prieto, M. (2021). Health Promoting Properties of Bee Royal Jelly: Food of the Queens. *Nutrients*, 13(2). <https://doi.org/10.3390/nu13020543>
- Cummings, B. (2007). Phospholipase A2 as targets for anti-cancer drugs. *Biochemical Pharmacology*, 74(7), 949-959. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.04.021>
- Čivljak, R., Giannella, M., Di Bella, S., & Petrosillo, N. (2013). Could chloramphenicol be used against ESKAPE pathogens? A review of in vitro data in the literature from the 21st century. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 12(2), 249-264. <https://doi.org/10.1586/14787210.2014.878647>
- Danneels, E., Van Vaerenbergh, M., Debyser, G., Devreese, B., & de Graaf, D. (2015). Honeybee Venom Proteome Profile of Queens and Winter Bees as Determined by a Mass Spectrometric Approach. *Toxins*, 7(11), 4468-4483. <https://doi.org/10.3390/toxins7114468>
- Dempsey, C. (1990). The actions of melittin on membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, 1031(2), 143-161. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(90\)90006-X](https://doi.org/10.1016/0304-4157(90)90006-X)
- Dennis, E., Cao, J., Hsu, Y., Magrioti, V., & Kokotos, G. (2011). Phospholipase A 2 Enzymes: Physical Structure, Biological Function, Disease Implication, Chemical Inhibition, and Therapeutic Intervention. *Chemical Reviews*, 111(10), 6130-6185. <https://doi.org/10.1021/cr200085w>
- Diezel, W., Kopperschläger, G., & Hofmann, E. (1972). An improved procedure for protein staining in polyacrylamide gels with a new type of Coomassie Brilliant Blue. *Analytical Biochemistry*, 48(2), 617-620. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(72\)90117-0](https://doi.org/10.1016/0003-2697(72)90117-0)
- Dumitru, C., Neacsu, I., Grumezescu, A., & Andronescu, E. (2022). Bee-Derived Products: Chemical Composition and Applications in Skin Tissue Engineering. *Pharmaceutics*, 14(4). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14040750>
- Duplan, H., Questel, E., Hernandez-Pigeon, H., Galliano, M., Caruana, A., Ceruti, I., Ambonati, M., Mejean, C., Damour, O., Castex-Rizzi, N., Bessou-Touya, S., & Schmitt, A. (2011). Effects of Hydroxydecine® (10-hydroxy-2-decenoic acid) on skin barrier structure and function in vitro and clinical efficacy in the treatment of UV-induced xerosis. *European Journal of Dermatology*, 21(6), 906-915. <https://doi.org/10.1684/ejd.2011.1531>
- El-Gammal, E., Di Nardo, V., Daaboul, F., Tchernev, G., Wollina, U., Lotti, J., & Lotti, T. (2018). Apitherapy as a New Approach in Treatment of Palmoplantar Psoriasis. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 6(6), 1059-1061. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2018.135>
- Elieh Ali Komi, D., Shafaghat, F., & Zwiener, R. (2017). Immunology of Bee Venom. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 54, 386-396. <https://doi.org/10.1007/s12016-017-8597-4>
- El-Seedi, H., Abd El-Wahed, A., Yosri, N., Musharraf, S., Chen, L., Moustafa, M., Zou, X., Al-Mousawi, S., Guo, Z., Khatib, A., & Khalifa, S. (2020). Antimicrobial

Properties of *Apis mellifera*'s Bee Venom. *Toxins*, 12(7).
<https://doi.org/10.3390/toxins12070451>

Fazlani, S., Khan, S., Faraz, S., & Awan, M. (2011). Antimicrobial susceptibility of bacterial species identified from mastitic milk samples of camel. *African Journal of Biotechnology*, 10(15), 2959-2964. <https://doi.org/10.5897/AJB10.716>

Fernández, N., Porrini, M., Podaza, E., Damiani, N., Gende, L., & Eguaras, M. (2014). A scientific note on the first report of honeybee venom inhibiting *Paenibacillus* larvae growth. *Apidologie*, 45(6), 719-721. <https://doi.org/10.1007/s13592-014-0289-y>

Fratini, F., Cilia, G., Mancini, S., & Felicioli, A. (2016). Royal Jelly: An ancient remedy with remarkable antibacterial properties. *Microbiological Research*, 192, 130-141. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.06.007>

Frébortová, J. (2008). *Laboratorní cvičení z mikrobiologie* (1. vyd). Univerzita Palackého.

Frébortová, J. (2017). *Laboratorní cvičení z mikrobiologie*. Retrieved 2023-05-03, from http://www.rustreg.upol.cz/_materials/microbiology/skripta_Laboratorni-cviceni-z-mikrobiologie_2017.pdf

Gauldie, J., Hanson, J., Rumjanek, F., Shipolini, R., & Vernon, C. (1976). The Peptide Components of Bee Venom. *European Journal of Biochemistry*, 61(2), 369-376. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1976.tb10030.x>

Gennis, R. (1989). In *Biomembranes:: Molecular Structure and Function* (pp. 231–234). Springer New York.

Glass, C., Saijo, K., Winner, B., Marchetto, M., & Gage, F. (2010). Mechanisms Underlying Inflammation in Neurodegeneration. *Cell*, 140(6), 918-934. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.016>

Grandbois, M., Dufourcq, J., & Salesse, C. (1996). Study of the synergistic action of phospholipase A2 and melittin in the hydrolysis of phospholipid monolayers. *Thin Solid Films*, 284-285, 743-747. [https://doi.org/10.1016/S0040-6090\(95\)08436-3](https://doi.org/10.1016/S0040-6090(95)08436-3)

Habermann, E. (1972). Bee and Wasp Venoms. *Science*, 177(4046), 314-322.

Habermann, E., & Jentsch, J. (1967). Sequenzanalyse des Melittins aus den tryptischen und peptischen Spaltstücken. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*, 348(), 37-50. <https://doi.org/10.1515/bchm2.1967.348.1.37>

Hanson, J., Morley, J., & Soria-Herrera, C. (1974). Anti-inflammatory property of 401 (MCD-peptide), a peptide from the venom of the bee *Apis mellifera* (L.). *British Journal of Pharmacology*, 50(3), 383-392. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1974.tb09613.x>

Haon, M., Grisel, S., Navarro, D., Gruet, A., Berrin, J., & Bignon, C. (2015). Recombinant protein production facility for fungal biomass-degrading enzymes using the yeast *Pichia pastoris*. *Frontiers in Microbiology*, 6(45), 719–721. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01002>

Haon, M., Grisel, S., Navarro, D., Gruet, A., Berrin, J., & Bignon, C. (2015). Recombinant protein production facility for fungal biomass-degrading enzymes using the yeast *Pichia pastoris*. *Frontiers in Microbiology*, 6(1002). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01002>

Hellner, M., Winter, D., von Georgi, R., & Münstedt, K. (2008). Apitherapy: Usage and Experience in German Beekeepers. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 5(4), 475-479. <https://doi.org/10.1093/ecam/nem052>

Hood, J., Jallouk, A., Campbell, N., Ratner, L., & Wickline, S. (2013). Cytolytic Nanoparticles Attenuate HIV-1 Infectivity. *Antiviral Therapy*, 18(1), 95-103. <https://doi.org/10.3851/IMP2346>

- Hou, C., Guo, L., Lin, J., You, L., & Wu, W. (2014). Production of antibacterial peptide from bee venom via a new strategy for heterologous expression. *Molecular Biology Reports*, *41*(12), 8081-8091. <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3706-4>
- Hristova, K., Dempsey, C., & White, S. (2001). Structure, Location, and Lipid Perturbations of Melittin at the Membrane Interface. *Biophysical Journal*, *80*(2), 801-811. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)76059-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)76059-6)
- Chen, J., Guan, S., Sun, W., & Fu, H. (2016). Melittin, the Major Pain-Producing Substance of Bee Venom. *Neuroscience Bulletin*, *32*(3), 265-272. <https://doi.org/10.1007/s12264-016-0024-y>
- Choi, J., Jang, A., Lin, S., Lim, S., Kim, D., Park, K., Han, S., Yeo, J., & Seo, H. (2015). Melittin, a honeybee venom-derived antimicrobial peptide, may target methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Molecular Medicine Reports*, *12*(5), 6483-6490. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4275>
- Cho, S., Shim, S., Rhee, H., Park, H., Jung, W., Moon, S., Park, J., Ko, C., Cho, K., & Park, S. (2012). Effectiveness of acupuncture and bee venom acupuncture in idiopathic Parkinson's disease. *18*(8), 948-952. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2012.04.030>
- Isidorov, V., Buczek, K., Segiet, A., Zambrowski, G., & Swiecicka, I. (2018). Activity of selected plant extracts against honey bee pathogen *Paenibacillus larvae*. *Apidologie*, *49*(6), 687-704. <https://doi.org/10.1007/s13592-018-0586-y>
- Jo, M., Park, M., Kollipara, P., An, B., Song, H., Han, S., Kim, J., Song, M., & Hong, J. (2012). Anti-cancer effect of bee venom toxin and melittin in ovarian cancer cells through induction of death receptors and inhibition of JAK2/STAT3 pathway. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *258*(1), 72-81. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2011.10.009>
- Jung, S., Lee, K., Choi, S., & Yang, E. (2015). Bee Venom Protects against Rotenone-Induced Cell Death in NSC34 Motor Neuron Cells. *Toxins*, *7*(9), 3715-3726. <https://doi.org/10.3390/toxins7093715>
- Kamakura, M. (2011). Royalactin induces queen differentiation in honeybees. *Nature*, *473*(7348), 478-483. <https://doi.org/10.1038/nature10093>
- Khalil, A., Elesawy, B., Ali, T., & Ahmed, O. (2021). Bee Venom: From Venom to Drug. *Molecules*, *26*(16). <https://doi.org/10.3390/molecules26164941>
- Kochansky, J., Knox, D., Feldlaufer, M., & Pettis, J. (2001). Screening alternative antibiotics against oxytetracycline-susceptible and -resistant *Paenibacillus larvae*. *Apidologie*, *32*(3), 215-222. <https://doi.org/10.1051/apido:2001123>
- Koo, H., Rosalen, P., Cury, J., Park, Y., & Bowen, W. (2002). Effects of Compounds Found in Propolis on *Streptococcus mutans* Growth and on Glucosyltransferase Activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *46*(5), 1302-1309. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.5.1302-1309.2002>
- Kuzmenkov, A., Peigneur, S., Nasburg, J., Mineev, K., Nikolaev, M., Pinheiro-Junior, E., Arseniev, A., Wulff, H., Tytgat, J., & Vassilevski, A. (2022). Apamin structure and pharmacology revisited. *Frontiers in Pharmacology*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.977440>
- Ladokhin, A., Selsted, M., & White, S. (1997). Sizing membrane pores in lipid vesicles by leakage of co-encapsulated markers: pore formation by melittin. *Biophysical Journal*, *72*(4), 1762-1766. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78822-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78822-2)
- Lambeau, G., Barhanin, J., Schweitz, H., Qar, J., & Lazdunski, M. (1989). Identification and properties of very high affinity brain membrane-binding sites for a neurotoxic phospholipase from the taipan venom. *The Journal of biological chemistry*, *264*(19), 11503-11510.
- Lambeau, G., Schmid-Alliana, A., Lazdunski, M., & Barhanin, J. (1990). Identification and purification of a very high affinity binding protein for toxic

phospholipases A2 in skeletal muscle. *The Journal of biological chemistry*, 265(16), 9526–9532.

Lamy, C., Goodchild, S., Weatherall, K., Jane, D., Liégeois, J., Seutin, V., & Marrion, N. (2010). Allosteric Block of KCa2 Channels by Apamin. *Journal of Biological Chemistry*, 285(35), 27067-27077. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.110072>

Leandro, L., Mendes, C., Casemiro, L., Vinholis, A., Cunha, W., Almeida, R., & Martins, C. (2015). Antimicrobial activity of apitoxin, melittin and phospholipase A2 of honey bee (*Apis mellifera*) venom against oral pathogens. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 87(1), 147-155. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201520130511>

Lee, G., & Bae, H. (2016). Anti-Inflammatory Applications of Melittin, a Major Component of Bee Venom: Detailed Mechanism of Action and Adverse Effects. *Molecules*, 21(5). <https://doi.org/10.3390/molecules21050616>

Lee, J., Son, M., Choi, J., Jun, J., Kim, J., & Lee, M. (2014). Bee venom acupuncture for rheumatoid arthritis: a systematic review of randomised clinical trials. *BMJ Open*, 4(11). <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2014-006140>

Lee, K., Kim, B., Yoon, H., Choi, Y., & Jin, B. (2016). Secapin, a bee venom peptide, exhibits anti-fibrinolytic, anti-elastolytic, and anti-microbial activities. *Developmental and Comparative Immunology*, 63, 27-35.

Lee, S. (2016). Antifungal Activity of Bee Venom and Sweet Bee Venom against Clinically Isolated *Candida albicans*. *Journal of Pharmacopuncture*, 19(1), 45-50. <https://doi.org/10.3831/KPI.2016.19.006>

Mahmoodzadeh, A., Zarrinnahad, H., Bagheri, K., Moradia, A., & Shahbazzadeh, D. (2015). First report on the isolation of melittin from Iranian honey bee venom and evaluation of its toxicity on gastric cancer AGS cells. *Journal of the Chinese Medical Association*, 78(10), 574–583. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2015.06.008>

Maitip, J., Mookhploy, W., Khorndork, S., & Chantawannakul, P. (2021). Comparative Study of Antimicrobial Properties of Bee Venom Extracts and Melittins of Honey Bees. *Antibiotics*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/antibiotics10121503>

Majtan, J. (2009). Apitherapy - the Role of Honey in the Chronic Wound Healing Process. *Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie*, 58(3), 137-140.

Márquez, N., Sancho, R., Macho, A., Calzado, M., Fiebich, B., & Muñoz, E. (2004). Caffeic Acid Phenethyl Ester Inhibits T-Cell Activation by Targeting Both Nuclear Factor of Activated T-Cells and NF- κ B Transcription Factors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 308(3), 993-1001. <https://doi.org/10.1124/jpet.103.060673>

Mašek, T., Perin, N., Racané, L., Cindrić, M., Čipčić Paljetak, H., Perić, M., Matijašić, M., Verbanac, D., Radić, B., Šuran, J., & Starčević, K. (2018). Chemical Composition, Antioxidant and Antibacterial Activity of Different Extracts of Poplar Type Propolis. *Croatica Chemica Acta*, 91(1). <https://doi.org/10.5562/cca3298>

Memariani, H., Memariani, M., Moravvej, H., & Shahidi-Dadras, M. (2020). Melittin: a venom-derived peptide with promising anti-viral properties. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 39(1), 5–17. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03674-0>

Molan, P. (2015). The Antibacterial Activity of Honey. *Bee World*, 73(1), 5-28. <https://doi.org/10.1080/0005772X.1992.11099109>

Moreno, M., & Giralt, E. (2015). Three Valuable Peptides from Bee and Wasp Venoms for Therapeutic and Biotechnological Use: Melittin, Apamin and Mastoparan. *Toxins*, 7(4), 1126-1150. <https://doi.org/10.3390/toxins7041126>

Mourre, C., Lazdunski, M., & Jarrard, L. (1997). Behaviors and neurodegeneration induced by two blockers of K channels, the mast cell degranulating peptide and

Dendrotoxin I. *Brain Research*, 762(1-2), 223-227. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(97\)00481-2](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(97)00481-2)

Münstedt, K., & Männle, H. (2020). Seasonal allergic rhinitis and the role of apitherapy. *Allergologia et Immunopathologia*, 48(6), 582-588. <https://doi.org/10.1016/j.aller.2020.03.015>

Nandy, S., & Venkatesh, K. (2014). Study of CFU for individual microorganisms in mixed cultures with a known ratio using MBRT. *AMB Express*, 4(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-014-0038-7>

Nicolas, J., Lin, Y., Lambeau, G., Ghomashchi, F., Lazdunski, M., & Gelb, M. (1997). Localization of Structural Elements of Bee Venom Phospholipase A2 Involved in N-type Receptor Binding and Neurotoxicity. *Journal of Biological Chemistry*, 272(11), 7173-7181. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.11.7173>

Olajuyigbe, O., & Coopoosamy, R. (2014). Influence of First-Line Antibiotics on the Antibacterial Activities of Acetone Stem Bark Extract of *Acacia mearnsii* De Wild. against Drug-Resistant Bacterial Isolates. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2014/423751>

Pai, V., Rao, V., & Rao, S. (2010). Prevalence and Antimicrobial Susceptibility Pattern of Methicillin-resistant *Staphylococcus Aureus* [MRSA] Isolates at a Tertiary Care Hospital in Mangalore, South India. *Journal of Laboratory Physicians*, 2(02), 082-084. <https://doi.org/10.4103/0974-2727.72155>

Park, H., Lee, K., Kim, B., Yoon, H., Choi, Y., Lee, K., Wan, H., Li, J., & Jin, B. (2018). Honeybee (*Apis cerana*) vitellogenin acts as an antimicrobial and antioxidant agent in the body and venom. *Developmental and Comparative Immunology*, 85, 51-60. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.04.001>

Park, M., Choi, M., Kwak, D., Oh, K., Yoon, D., Han, S., Song, H., Song, M., & Hong, J. (2011). Anti-cancer effect of bee venom in prostate cancer cells through activation of caspase pathway via inactivation of NF- κ B. *The Prostate*, 71(8), 801-812. <https://doi.org/10.1002/pros.21296>

Pivec, G. (2017). *Filip Terč - Průkopník moderní apiterapie*. Pracovní společnost nástavkových včelařů CZ.

Raghuraman, H., & Chattopadhyay, A. (2007). Melittin: a Membrane-active Peptide with Diverse Functions. *Bioscience Reports*, 27(4-5), 189-223. <https://doi.org/10.1007/s10540-006-9030-z>

Sabatini, A. (2009). Quality and standardisation of Royal Jelly. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, 1(1), 16-21. <https://doi.org/10.3896/IBRA.4.01.1.04>

Sameh, A., Gouda, A., Elmligy, E., Hatem, H., Sadek, S., Ahmed, O., & El Amir, A. (2023). Bee venom as an alternative for antibiotics against *Staphylococcus aureus* infections. *Scientific Reports*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-33536-x>

Sharif, S., & Darsareh, F. (2019). Effect of royal jelly on menopausal symptoms: A randomized placebo-controlled clinical trial. *Complementary Therapies in Clinical Practice*, 37, 47-50. <https://doi.org/10.1016/j.ctcp.2019.08.006>

Shkenderov, S., & Koburova, K. (1982). Adolapin - A newly isolated analgetic and anti-inflammatory polypeptide from bee venom. *Toxicon*, 20(1), 317-321. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(82\)90234-3](https://doi.org/10.1016/0041-0101(82)90234-3)

Silva, L., Ramos, E., Ambiel, C., Correia-de-Sá, P., & Alves-Do-Prado, W. (2010). Apamin reduces neuromuscular transmission by activating inhibitory muscarinic M2 receptors on motor nerve terminals. *European Journal of Pharmacology*, 626(2-3), 239-243. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.09.064>

Smejkal, G. (2014). The Coomassie chronicles: past, present and future perspectives in polyacrylamide gel staining. *Expert Review of Proteomics*, 1(4), 381-387. <https://doi.org/10.1586/14789450.1.4.381>

Stanworth, D., Kings, M., Roy, P., Moran, J., & Moran, D. (1979). Synthetic peptides comprising sequences of the human immunoglobulin E heavy chain capable of releasing histamine. *Biochemical Journal*, 180(3), 665-668. <https://doi.org/10.1042/bj1800665>

Šedivá, M., Laho, M., Kohútová, L., Mojžišová, A., Majtán, J., & Klaudivy, J. (2018). 10-HDA, A Major Fatty Acid of Royal Jelly, Exhibits pH Dependent Growth-Inhibitory Activity Against Different Strains of *Paenibacillus* larvae. *Molecules*, 23(12). <https://doi.org/10.3390/molecules23123236>

Taavoni, S., Barkhordari, F., Goushegir, A., & Haghani, H. (2014). Effect of Royal Jelly on premenstrual syndrome among Iranian medical sciences students: A randomized, triple-blind, placebo-controlled study. *Complementary Therapies in Medicine*, 22(4), 601-606. <https://doi.org/10.1016/j.ctim.2014.05.004>

Tabish, S. (2008). Complementary and Alternative Healthcare: Is it Evidence-based?. *International journal of health sciences*, 2(1).

Taylor, J., Bidard, J., & Lazdunski, M. (1984). The characterization of high-affinity binding sites in rat brain for the mast cell-degranulating peptide from bee venom using the purified monoiodinated peptide. *Journal of Biological Chemistry*, 259(22), 13957-13967. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)89838-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)89838-6)

Teoh, A., Ryu, K., & Lee, E. (2017). One-Step Purification of Melittin Derived from *Apis mellifera* Bee Venom. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(1), 84-91. <https://doi.org/10.4014/jmb.1608.08042>

Tesio, L. (2013). Alternative Medicines. *American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation*, 92(6), 542-545. <https://doi.org/10.1097/PHM.0b013e318282c937>

Tosteson, M., & Tosteson, D. (1981). The sting. Melittin forms channels in lipid bilayers. *Biophysical Journal*, 36(1), 109-116. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(81\)84719-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(81)84719-4)

Trumbeckaite, S., Dauksiene, J., Bernatoniene, J., & Janulis, V. (2015). Knowledge, Attitudes, and Usage of Apitherapy for Disease Prevention and Treatment among Undergraduate Pharmacy Students in Lithuania. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2015/172502>

Tsatsakis, A., Vassilopoulou, L., Kovatsi, L., Tsitsimpikou, C., Karamanou, M., Leon, G., Liesivuori, J., Hayes, W., & Spandidos, D. (2018). The dose response principle from philosophy to modern toxicology: The impact of ancient philosophy and medicine in modern toxicology science. *Toxicology Reports*, 5, 1107-1113. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2018.10.001>

Tsourkas, P. (2020). *Paenibacillus* larvae bacteriophages: obscure past, promising future. *Microbial Genomics*, 6(2). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000329>

Tufail, M., & Takeda, M. (2008). Molecular characteristics of insect vitellogenins. *Journal of Insect Physiology*, 54(12), 1447-1458. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2008.08.007>

Uddin, M., Lee, B., Nikapitiya, C., Kim, J., Kim, T., Lee, H., Kim, C., Lee, J., & Kim, C. (2016). Inhibitory effects of bee venom and its components against viruses in vitro and in vivo. *Journal of Microbiology*, 54(12), 853-866. <https://doi.org/10.1007/s12275-016-6376-1>

van den Bogaart, G., Guzmán, J., Mika, J., & Poolman, B. (2008). On the Mechanism of Pore Formation by Melittin. *Journal of Biological Chemistry*, 283(49), 33854-33857. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805171200>

- Van Vaerenbergh, M., Debyser, G., Devreese, B., & de Graaf, D. (2014). Exploring the hidden honeybee (*Apis mellifera*) venom proteome by integrating a combinatorial peptide ligand library approach with FTMS. *Journal of Proteomics*, *99*, 169-178. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.04.039>
- Vorlová, L., Karpíšková, R., Chabinioková, I., Kalábová, K., & Brázdová, Z. (2011). The antimicrobial activity of honeys produced in the Czech Republic. *Czech Journal of Animal Science*, *50*(8), 376-384. <https://doi.org/10.17221/4180-CJAS>
- Votava, M., Růžička, F., Woznicová, V., Černohorská, L., Dvořáčková, M., Dvořáková Heroldová, M., Holá, V., & Zahradníček, O. (2010). *Lékařská mikrobiologie - vyšetřovací metody*. Neptun.
- Wall, G., & Lopez-Ribot, J. (2020). Current Antimycotics, New Prospects, and Future Approaches to Antifungal Therapy. *Antibiotics*, *9*(8). <https://doi.org/10.3390/antibiotics9080445>
- Watala, C., & Kowalczyk, J. (1990). Hemolytic potency and phospholipase activity of some bee and wasp venoms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, *97*(1), 187-194. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(90\)90191-B](https://doi.org/10.1016/0742-8413(90)90191-B)
- Wehbe, R., Frangieh, J., Rima, M., El Obeid, D., Sabatier, J., & Fajloun, Z. (2019). Bee Venom: Overview of Main Compounds and Bioactivities for Therapeutic Interests. *Molecules*, *24*(16). <https://doi.org/10.3390/molecules24162997>
- Weis, W., Ripari, N., Conte, F., Honorio, M., Sartori, A., Matucci, R., & Sforcin, J. (2022). An overview about apitherapy and its clinical applications. *Phytomedicine Plus*, *2*(2). <https://doi.org/10.1016/j.phyplu.2022.100239>
- Welker, S., Markert, Y., Köditz, J., Mansfeld, J., & Ulbrich-Hofmann, R. (2011). Disulfide bonds of phospholipase A2 from bee venom yield discrete contributions to its conformational stability. *Biochimie*, *93*(2), 195-201. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.09.012>
- Willix, D., Molan, P., & Harfoot, C. (1992). A comparison of the sensitivity of wound-infecting species of bacteria to the antibacterial activity of manuka honey and other honey. *Journal of Applied Bacteriology*, *73*(5), 388-394. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1992.tb04993.x>
- Yang, L., Harroun, T., Weiss, T., Ding, L., & Huang, H. (2001). Barrel-Stave Model or Toroidal Model? A Case Study on Melittin Pores. *Biophysical Journal*, *81*(3), 1475-1485. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)75802-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)75802-X)
- Yang, X., Wang, T., & Wang, R. (2014). Antibacterial Activity and Mechanism of Action of 10-HDA Against *Escherichia coli*. *Proceedings of the 2012 International Conference on Applied Biotechnology (ICAB 2012)*, 585-595. https://doi.org/10.1007/978-3-642-37916-1_60
- Zheng, J., Lee, H., Ham, Y., Song, H., Song, M., & Hong, J. (2015). Anti-cancer effect of bee venom on colon cancer cell growth by activation of death receptors and inhibition of nuclear factor kappa B. *Oncotarget*, *6*(42), 44437-44451. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6295>
- Zolfagharian, H., Mohajeri, M., & Babaie, M. (2016). Bee Venom (*Apis Mellifera*) an Effective Potential Alternative to Gentamicin for Specific Bacteria Strains. *Journal of Pharmacopuncture*, *19*(3), 225-230. <https://doi.org/10.3831/KPI.2016.19.023>

7 Seznam zkratek

10-HDA	kyselina včelí matky, 10-hydroxy-2-decenová kyselina (angl. „10-hydroxy-2-decenoic acid“)
AIDS	syndrom získaného selhání imunity (z angl. „acquired immunodeficiency syndrome“)
bvPLA2	fosfolipasa A2 ze včelího jedu (angl. „bee venom phospholipase A2“)
Ca ²⁺	vápenatý ion
CAM	komplementární a alternativní medicína (angl. „Complementary and alternative medicine“)
CCM	Česká sbírka mikroorganismů
CD14	diferenční klastr 14 (angl. „cluster of differentiation 14“)
CM-FF	karboxymethyl Sepharosa Fast Flow
CNS	centrální nervový systém
COVID-19	koronavirové onemocnění 2019 (angl. „coronavirus disease 2019“)
DR	receptor smrti (angl. „death receptor“)
ERK	extracelulárním signálem regulovatelné kinasy
Fab oblast	fragmentová oblast vázající antigen (angl. „fragment antigen binding“)
G ⁻	gramnegativní (bakterie)
G ⁺	grampozitivní (bakterie)
HIV1	virus lidské imunitní nedostatečnosti (z angl. „human immunodeficiency virus 1“)
CHL	chloramfenikol
I-IFN	interferon I
KAN	kanamycin
KTJ/CFU	kolonie tvořící jednotka (angl. „colony-forming unit“)
MAP kinasa	mitogen aktivovaná protein kinasa
MCDP	peptid degranulující žírné buňky (angl. „mast cell degranulating peptide“)
MIC	minimální inhibiční koncentrace (angl. „minimal inhibitory concentration“)
MRJP	hlavní proteiny mateří kašičky (angl. „major royal jelly proteins“)
MK	mateří kašička
MO	mikroorganismus
MRSA	methicillin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
NEMO	esenciální modulátor faktoru NF-κB
NF-κB	nukleární faktor kappa B
NK cells	buňky přirozených zabijáků (angl. „natural killers cells“)

OD ₆₀₀	optická hustota při vlnové délce 600 nm (angl. „optical density“)
PDGFR β	receptor beta růstového faktoru krevních destiček (angl. „platelet-derived growth factor receptor beta“)
PGE ₂	prostaglandin E ₂
PKB	protein-kinasa B
PLA ₂	fosfolipasa A ₂
PLC γ 1	fosfolipasa C gama 1
SP-FF	sulfopropyl Sepharosa Fast Flow
STAT	přenašeč signálu a transkripční faktor (angl. „signal transducer and activator of transcription“)
TLR	toll-like receptory
TNF	tumor nekrotizující faktor
TTC	tetracyclin
VJ	včelí jed
WAO	Světová alergologická organizace (angl. World Allergy Organization)