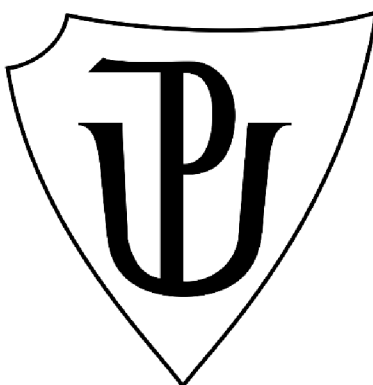


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biotechnologií



Studium funkce NADPH-oxidas a duálních oxidas v imunitních odpovědích včely medonosné

Autor: **Bc. Adam Kiška**

Studijní program: N0512A130007 Biotechnologie a genové inženýrství

Specializace: Biotechnologie a genové inženýrství

Forma studia: Prezenční

Vedoucí práce: **prof. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.**

Rok: 2023

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

V Olomouci dne

.....
Podpis studenta

Rád bych poděkoval svému školiteli prof. Mgr. Markovi Petřivalskému, Dr. za cenné rady a odborné vedení práce. Dále bych chtěl poděkovat celému kolektivu Katedry biochemie za vstřícnost, výpomoc a výbornou společnost v laboratoři. Chtěl bych také poděkovat Véronique Héléne Bergougnoux-Fojtik, Ph.D. a Mgr. Davidu Kopečnému za možnost využití ultracentrifugy a pomoc s její obsluhou. V neposlední řadě mé díky patří i Katedře biotechnologií, obzvláště Mgr. Olze Šamajové, Dr., za pomoc při práci s mikroskopy.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Adam Kiška
Název práce	Studium funkce NADPH-oxidasy a duálních oxidas v imunitních odpovědích včely medonosné
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	prof. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.
Rok obhajoby práce	2023

Abstrakt

Teoretická část diplomové práce je zaměřena na charakterizaci reaktivních forem kyslíku a antioxidačních systémů a jejich funkci v organismech obecně. Dále se práce zabývá NADPH a duálními oxidasami (Nox a Duox) hmyzu, především včel medonosných, a jejich úlohou v imunitě a signalizaci. Důraz byl kladen na popis imunitních procesů v trávicí soustavě, kde Nox a Duox hrají významnou roli v interakci střevního epitelu s mikroby. Poslední část literární rešerše se zabývá problematikou metod stanovení reaktivních forem kyslíku a popisem fluorescenčních prób používaných v experimentální části práce.

Experimentální část práce je zaměřena na srovnání fluorescenčních metod využívaných ke kvantifikaci H_2O_2 a jejich optimalizace při stanovování aktivity Nox a Duox ve vzorcích trávicí soustavy včel. Další práce byla zaměřena na kvantifikaci obsahu H_2O_2 v trávicí soustavě včel vystavených modelovému imunitnímu elicitoru (bakteriálním lipopolysacharidům LPS) a induktoru oxidativního stresu (herbicidu paraquat PQ). Poslední část práce se zabývá využitím fluorescenční próby R19S k histochemické detekci produktu duálních oxidas (HClO) v trávicí soustavě včel.

Ze srovnání fluorescenčních prób vyšla jako jediná použitelná v homogenátech AmplexRed. Ta byla dále použita k měření koncentrace H_2O_2 v trávicích soustavách včel ovlivněných LPS a PQ. Ukázalo se, že PQ ovlivňuje tvorbu ROS pouze v prvních 2 h. Při vystavení včel LPS byla tvorba ROS závislá spíše na stáří včel; naměřené hladiny H_2O_2 navíc nekorelují s aktivitou Nox/Duox. Histochemickou metodou s R19S byla potvrzena tvorba HClO ve střevech včel po indukci uracilem.

Klíčová slova Duální oxidasy, imunita, NADPH-oxidasy, octomilka obecná, reaktivní formy kyslíku, signalizace, včela medonosná

Počet stran	77
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Adam Kiška
Title	Studies of functions of NADPH oxidases and dual oxidases in immune responses of honey bees
Type of thesis	Diploma
Department	Department of biochemistry
Supervisor	prof. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.
The year of presentation	2023

Abstract

The theoretical part of the thesis is focused on the characterization of reactive oxygen species and antioxidant systems and their function in organisms in general. Furthermore, the thesis focuses on NADPH and dual oxidases (Nox and Duox) in insects, especially honey bees, and their role in immunity and signalling. Emphasis has been placed on the description of immune processes in the digestive system, where Nox and Duox play an important role in the interactions of the intestinal epithelium with microbes. The last part of the literature review deals with the methods of reactive oxygen species determination and description of fluorescence assays used in the experimental part of the work.

The experimental part of the thesis is focused on the comparison of fluorimetric methods used for H₂O₂ quantification and their optimization in the determination of Nox and Duox activity in bee digestive system samples. Further work focused on the quantification of H₂O₂ content in the digestive system of bees exposed to a model immune elicitor (bacterial lipopolysaccharides LPS) and an inducer of oxidative stress (herbicide paraquat PQ). The last part of the thesis deals with the use of R19S as a fluorescent probe for the histochemical detection of the dual oxide product (HClO) in the digestive system of bees.

From the comparison of fluorescence assays, AmplexRed was the only one applicable in homogenates. It was further used to measure H₂O₂ concentrations in the digestive systems of bees affected by LPS and PQ. It was shown that PQ affects ROS production only in the first 2 h. When bees were exposed to LPS, ROS production was dependent on the age of the bees; in addition, the measured H₂O₂ levels do not correlate with Nox/Duox activity. The histochemical method with R19S confirmed formation of HClO in the gut of bees after induction with uracil.

Keywords	Dual oxidases, fruit fly, honeybee, immunity, NADPH-oxidases, reactive oxygen species, signalization
Number of pages	77
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

1 Úvod	1
2 Současný stav řešené problematiky	2
2.1 ROS a jejich biologické funkce	4
2.1.1 Oxidativní stres a antioxidační systémy	5
2.1.2 ROS v imunitě	6
2.1.3 ROS v senescenci	7
2.2 Molekulární vlastnosti Nox/Duox	8
2.2.1 Struktura Nox/Duox	9
2.2.2 Mechanismy regulace exprese a aktivity Nox/Duox	11
2.2.3 Lokalizace Nox/Duox	12
2.3 Role Nox/Duox v imunitě a signalizaci	13
2.3.1 Hemocyty	16
2.3.2 Role Duox v trávicím traktu	18
2.3.3 Role Nox v trávicím traktu	19
2.3.4 Nox/Duox v signalizaci a obnově buněk	21
2.5 Přehled metod stanovení aktivity Nox/Duox	22
2.5.1 Kvantifikace produkce ROS	23
2.5.1.1 Metoda s AR	24
2.5.1.2 Metoda HVA	26
2.5.1.3 Metoda se skopoletinem	27
2.5.2 Využití R19S pro histochemickou detekci HClO	28
3 Experimentální část	30
3.1 Materiál	30
3.1.1 Chemikálie	30
3.1.2 Přístroje a vybavení	30
3.1.3 Biologický materiál	31
3.1.4 Příprava zásobních roztoků	31
3.2 Metody	32
3.2.1 Přechování včel a jejich expozice elicitorům	32
3.2.2 Příprava vzorků ze včel pro fluorimetrická měření	32
3.2.3 Příprava vzorků k ultracentrifugaci	34
3.2.4 Stanovení celkového obsahu proteinů Bradfordovou metodou	34
3.2.4.1 Příprava pracovního roztoku Bradfordova činidla	34
3.2.4.2 Příprava standardů hovězího sérového albuminu (BSA)	34
3.2.4.3 Postup měření absorbance	35
3.2.5 Fluorimetrická kvantifikace H ₂ O ₂	35
3.2.5.1 Příprava standardů H ₂ O ₂ pro kalibrační křivky fluorimetrických metod	35
3.2.5.2 Reakce ovlivňující aktivitu Nox/Duox	35
3.2.5.3 Stanovení H ₂ O ₂ metodami s AR, HVA a skopoletinem	36
3.2.6 Histochemická detekce HClO metodou s R19S	38
3.2.6.1 Ověření fluorescenčních vlastností R19S	38
3.2.6.2 Příprava vzorků pro histochemickou detekci HClO	38
3.2.6.3 Mikroskopická pozorování	39
4 Výsledky	40
4.1 Sledování vlivu testovaných látek na celkovou koncentraci proteinů	40
4.1.1 Určení kalibrační přímky pro stanovení proteinů Bradfordovou metodou	40
4.1.2 Stanovení koncentrace proteinů biologických vzorků	41
4.2 Stanovení obsahu H ₂ O ₂ fluorimetrickou metodou s AR	42

4.2.1 Určení excitačního a emisního spektra resorufinu	42
4.2.2 Určení kalibrační přímky	43
4.2.3 Stanovení aktivity Nox/Duox	44
4.2.4 Srovnání vlivu aktivity HRP v reakčním činidlu na naměřené hodnoty fluorescence	46
4.3 Stanovení obsahu H ₂ O ₂ fluorimetrickou metodou s HVA	47
4.3.1 Určení kalibrační přímky	47
4.3.2 Stanovení aktivity Nox/Duox	47
4.4 Stanovení obsahu H ₂ O ₂ fluorimetrickou metodou se skopoletinem	48
4.4.1 Určení kalibrační přímky	48
4.4.2 Stanovení aktivity Nox/Duox	49
4.5 Stanovení koncentrace H ₂ O ₂ ve včelách ovlivněných LPS a PQ	50
4.6 Histochemická analýza aktivity Duox s detekcí HClO	54
4.6.1 Testování fluorescenční sondy R19S	54
4.6.2 Mikroskopická pozorování s využitím R19S	56
4.6.2.1 Včely krmené R19S	56
4.6.2.2 Střeva včel inkubovaná s R19S	58
5 Diskuze	61
6 Závěr	65
7 Literatura	67
8 Seznam použitých zkratk	76

Cíle práce

- Vypracovat literární rešerši shrnující aktuální poznatky o vlastnostech, funkci a významu reaktivních forem kyslíku (ROS) a enzymů jejich produkce NADPH-oxidás (Nox) a duálních oxidás (Duox) v imunitě hmyzu
- Optimalizovat metody stanovení enzymové aktivity Nox/Duox ve vzorcích tkání včel
- Studovat změny aktivity Nox/Duox ve vzorcích včel infikovaných bakteriálními patogeny a elicitory

1 Úvod

Včela medonosná (*Apis mellifera*) má nenahraditelnou úlohu jako opylovač rostlin, což zajišťuje udržitelnost zemědělství. Divoké druhy včel dále zvyšují biodiverzitu krajiny. Celosvětově jsou včely zodpovědné za opylování až poloviny nesamosprašných plodin, z ekonomického a ekologického hlediska jsou tak velmi významným hospodářským zvířetem. V posledních letech bohužel populace včel zažívají vysoké ztráty. Mezi hlavní důvody patří přítomnost pesticidů a insekticidů v životním prostředí či zavlečení nových druhů virů, bakterií, hub a škůdců. Přesné fungování včelího imunitního systému je tedy předmětem mnoha studií.

Tvorba reaktivních forem kyslíku (ROS) v trávicím traktu živočichů patří mezi jednu z prvních obranných reakcí imunitního systému na infekci patogenními organismy. ROS jsou skupinou chemicky reaktivních iontů, radikálů a molekul vzniklých z kyslíku. V minulosti se předpokládalo, že se jedná o vedlejší produkt aerobního metabolismu a jejich role v organismu je pouze negativní. Při vyšší koncentraci totiž vykazují pro buňky toxické vlastnosti – např. poškození DNA nebo oxidaci lipidů a proteinů, což může vést k buněčnému stárnutí a smrti. Dnešní pohled je ovšem takový, že významná část ROS vzniká kontrolovanými mechanismy, převážně enzymy z rodiny NADPH a duálních oxidas (Nox a Duox, EC 1.6.3.1), a mají pro fungování organismu nezbytné vlastnosti. V menší koncentraci ROS fungují jako signální molekuly a ve vyšší koncentraci pak mikrobicidně. Mají však také řadu dalších fyziologických funkcí, např. v tvrdnutí vaječného obalu nebo střevní peristaltice. V organismu tak plní duální roli v závislosti na koncentraci, která je místně i časově specificky řízena nejen Nox/Duox, ale také řadou antioxidačních systémů.

Mnoho rolí ROS v imunitě a signalizaci je i přes pokračující výzkum stále nepopsaných. Studium Nox/Duox tedy pomáhá pochopit důležité mechanismy, které jsou zodpovědné za obranyschopnost nejen lidí, ale třeba také stále více ohrožených včel, na které je zaměřena tato práce.

2 Současný stav řešené problematiky

Imunitní systém hmyzu je oproti tomu obratlovců výrazně jednodušší. Hmyz postrádá tzv. získanou imunitu – lymfocyty tvořící protilátky a paměťové buňky. Jako u všech zástupců skupiny bezobratlých dělíme jejich imunitu pouze na vrozené (neadaptivní) složky – buněčnou a humorální (Hoffmann, 1995).

Do buněčné složky řadíme přímé interakce hemocytů (fagocytujících buněk) s patogeny v hemolymfě hmyzu. K humorální složce patří látky produkované k interakci s mikroorganismy, především antimikrobiální peptidy (AMP), komplementu podobné proteiny, melanin nebo ROS (Bergin *et al.*, 2005; Strand, 2008). Velmi důležité jsou také imunitní procesy v trávicí soustavě. Ta je u hmyzu opět jednodušší jak fyziologií, tak rozsahem druhů, které mohou tvořit střevní mikrobiom. Patogenní i symbiotické mikroorganismy působí přímo na epitelové buňky trávicí soustavy a složitá síť signalizace a imunitních reakcí zajišťuje homeostázu.

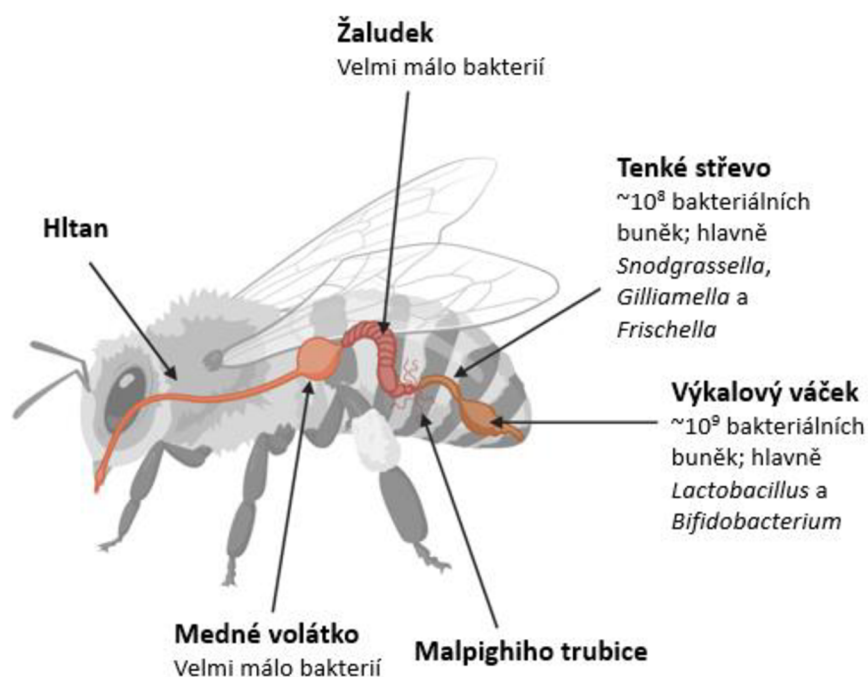
Podobnost hemocytů s fagocyty, jednodušší trávicí soustava a ortologní enzymy (nejen Nox/Duox) dělají z hmyzu, především octomilek obecných (*Drosophila melanogaster*), ideální model pro studium vrozené imunity živočichů (Browne *et al.*, 2013). Genetické a molekulární přístupy totiž ukázaly, že mechanismy vrozené imunity se zdají být konzervované u všech živočichů (Ratiu *et al.*, 2016). Nové informace o imunitě jsou tedy podstatné také pro významné hospodářské druhy hmyzu jako je včela medonosná.

Včely jsou eusociální organismy rozdělené do kast – matky, trubci a dělnice. První dvě jsou téměř výhradně zaměřené na reprodukci; matka je v úlu jediná plně vyvinutá včela samičího pohlaví, trubci jsou samci, kterých je v úlu několik set. Dělnice jsou sterilní včely samičího pohlaví, které se v přítomnosti matky nejsou schopny rozmnožovat a v úlu plní udržovací funkce (Amdam *et al.*, 2005). Obvykle jich v jednom včelstvu může být 30-50 tisíc. Mladé včely (3-18 dní) se starají o chod včelstva – např. zpracování potravy a starost o larvy. Starší včely (18-65 dní) figurují v energeticky náročnějších úkolech jako je obrana úlu nebo hledání a sběr potravy (Free, 1965).

V mírném pásu s příchodem zimy umírá letní generace dělnic a rodí se generace tzv. zimních včel. Zimní včely jsou dlouhověké (dožívají se v průměru 240 dní) a dobře tolerují stres. Jejich hlavním úkolem je úklid úlu a udržování konstantní teploty. S příchodem jara pak zajišťují chod hnízda a výchovu prvních nových dělnic (Omholt a Amdam, 2004).

U včel medonosných a dalších druhů sociálního hmyzu se vyvinula ještě další složka imunity – sociální. Do ní řadíme společnou obranu hnízda před patogeny a škůdci, ale třeba také jeho čištění. Včely (a další druhy sociálního hmyzu) oproti octomilkám vykazují snížené množství genů obvykle spojených s imunitou, detoxifikací nebo tvorbou kutikuly, např. množství fagocytujících hemocytů včel může být až dvacetinásobně nižší než u octomilek (Gábor *et al.*, 2020). Na druhou stranu včely napadá relativně málo patogenů, kteří jsou schopni proniknout až do hemolymfy. Předpokládá se, že snížené množství patogenů i obranných genů je evoluční důsledek právě sociální imunity (Weinstock *et al.*, 2006; Doublet *et al.*, 2017).

Střevní mikrobiom zdravých včel tvoří 9 rodů bakterií nacházejících se převážně ve výkalovém váčku (Obr. 1) (Kwong a Moran, 2016). Pět z nich bylo nalezeno v dělnicích na celém světě, konkrétně *Snodgrassella alvi*, *Gilliamella apicola*, dva druhy *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. Abundance dalších (*Bartonella apis*, *Apibacter adventoris*, *Frischella perrara* a bakterie rodu *Acetobacter*) je variabilní. Menší množství těchto bakterií se nachází také v přední části zažívacího traktu a žaludku.

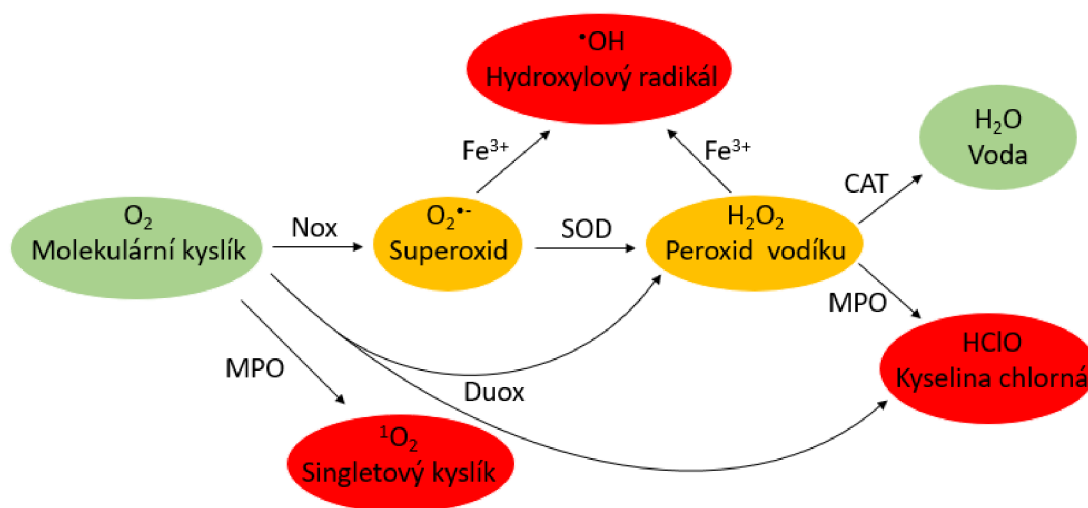


Obr. 1: Schématické zobrazení trávicí soustavy včely medonosné včetně bakteriálních komunit tvořících mikrobiom. Vytvořeno v programu BioRender.

2.1 ROS a jejich biologické funkce

ROS je kolektivní termín používaný pro molekuly vzniklé z molekulárního kyslíku O_2 , které jsou reaktivnější než O_2 samotný (Obr. 2). Označuje nejen radikály jako je např. superoxidový anionradikál $O_2^{\cdot-}$, ale také sloučeniny jako peroxid vodíku H_2O_2 , kyselina chlorná $HClO$ nebo v minulosti sloučeniny s dusíkem. Ty jsou v současnosti často samostatně označovány jako reaktivní formy dusíku. Pojem reaktivní je ovšem velmi relativní – $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 jsou v reakcích s biologickými molekulami selektivní, ale např. hydroxylový radikál $\cdot OH$ reaguje s většinou organických molekul (Murphy *et al.*, 2022).

Objevy nových rolí ROS v různých procesech organismů vedly ke zvýšenému zájmu vědců o tuto oblast. To s sebou samozřejmě v průběhu doby přineslo mnoho nových metod studia ROS, oxidativního poškození a redoxní signalizace. Jednou z výzev je správná interpretace těchto měření, které je stále v mnoha případech nespecifické a nepřímé, nebo naopak velmi komplexní. Velké množství nových výsledků může také vést k zobecňování termínů – ROS se tedy můžou jevit jako samostatná molekulární entita, i když se jedná o heterologní skupinu molekul s různými biologickými a chemickými vlastnostmi. Generalizace pojmu ROS tak může být zavádějící a nespecifikuje, který typ způsobuje pozorovaný biologický efekt (Murphy *et al.*, 2022).



Obr. 2: Schéma metabolismu základních forem ROS. Jednotlivé typy ROS a jejich metabolitů jsou odlišeny barevně podle reaktivity, specifity a možnosti způsobit oxidativní poškození: zelená – relativně nereaktivní a neškodné; oranžová – specifická reaktivita; červená – vysoká a nespecifická reaktivita. Vysvětlení zkratk: CAT – katalasa; Duox – duální oxidasa; MPO – myeloperoxidasa; Nox – NADPH-oxidasa; SOD – superoxididismutasa.

Tato práce je za měřená na 3 typy ROS – $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 a $HClO$. První dva typy nereagují s většinou biologických molekul. Reaktivita $O_2^{\cdot-}$ je selektivní, může fungovat jako reduktant i oxidant. Redukuje přechodné kovy (Fe^{3+} , Cu^{2+}), rychle také reaguje s oxidem dusnatým NO za tvorby peroxynitritu nebo s dalšími radikály za tvorby hydroperoxidů. Může poškozovat proteiny obsahující Fe-S klastry. Reaktivita H_2O_2 je ještě nižší, pomalu reaguje s některými přechodnými kovy za vzniku $\cdot OH$, dále s thioley nebo hemovou skupinou. Vzhledem ke stabilitě, možnosti procházet buněčnými membránami a selektivitou reakcí je H_2O_2 ideálním druhým poslem v signalizaci. $HClO$ je naopak vysoce reaktivní a silný oxidant, převážně thiolů, methioninu a cysteinu, s nimiž reaguje za tvorby sulfenových derivátů (Dickinson a Chang, 2011; Murphy *et al.*, 2022).

Kromě kontrolované aktivity Nox/Duox vznikají ROS také jako vedlejší produkty aerobní respirace či dalších metabolických procesů. Část ROS vzniká intracelulárně v mitochondriích, kdy elektrony přechází z redukovaných součástí elektron transportního řetězce přímo na O_2 za vzniku $O_2^{\cdot-}$. Dále mohou ROS vznikat v reakci na různé environmentální stimuly jako jsou např. UV záření, chemické oxidanty, toxiny nebo přechodné kovy (Olgun *et al.*, 2020).

2.1.1 Oxidativní stres a antioxidační systémy

Koncept oxidativního stresu byl původně definovaný jako narušení rovnováhy mezi prooxidativními molekulami a antioxidačními systémy. Dnes se o něm spíše uvažuje jako o narušení oxidačně-redukční signalizace a kontrolních mechanismů (Jones, 2006).

Podobné zobecňování pojmů (jako u ROS) se týká také antioxidantů, jejichž definování je ve vědecké literatuře často velmi obecné – jakákoliv molekula schopná zpomalit nebo zabránit oxidativnímu poškození. Navíc je nutné vzít v potaz, že neexistuje žádný ideální antioxidant. Ve skutečnosti různé molekuly reagují s různými typy ROS a chrání různé cíle oxidativního poškození, to vše v závislosti na buněčné lokalizaci. Alternativní definice zní: „molekula, která reaguje s oxidantem, čímž zabraňuje jeho reakci s ostatními možnými cíli, což ovlivňuje redoxní signalizaci a oxidativní poškození“ (Murphy *et al.*, 2022). Mezi hlavní antioxidační enzymy fungující *in vivo* patří katalasa (CAT, EC 1.11.1.6), peroxidasa (POX, EC 1.11.1.x) a superoxiddismutasa (SOD, EC 1.15.1.1). CAT rozkládají H_2O_2 přímo na H_2O a O_2 , zatímco POX redukcí H_2O_2 oxidují různé substráty. SOD redukuje $O_2^{\cdot-}$ na H_2O_2 (dismutace ovšem probíhá i samovolně). Mnoho sloučenin s nízkou molekulovou hmotností označovaných jako

„antioxidanty“ je vysoce specifických pouze k určitému typu ROS a s $O_2^{\cdot-}$ nebo H_2O_2 téměř nereagují (např. N-acetylcystein).

Podle Ha *et al.* (2005) je nejdůležitějším antioxidačním enzymem ve střevech octomilek CAT. Ahn *et al.* (2012) dále přišli na to, že významnou roli hraje také enzym peroxiredoxin5 (Prx5, EC 1.11.1.5). Prx jsou rodina POX, jejichž aktivní místo obsahuje redoxně aktivní cysteinový zbytek. Prx jsou schopny redukovat H_2O_2 , hydroperoxydy a peroxyinitrit. Transkripce *Prx5* je řízená signální drahou JNK/FOXO (Jun N-terminální kinasy/FOXO transkripční faktor) v závislosti na množství H_2O_2 produkovaného Duox v reakci na infekci patogenní bakterií *Erwinia carotovora*.

Při studiu oxidativního poškození nebo aktivace signálních drah je tedy výhodné používat selektivě vzniklé ROS. Nejčastěji využívanými sloučeninami s tímto účinkem jsou herbicid paraquat (PQ, N,N'-dimethyl-4,4'-bipyridinium dichlorid), který cyklicky generuje $O_2^{\cdot-}$, což se díky dismutaci projeví i na koncentraci H_2O_2 nebo přímá tvorba H_2O_2 enzymem glukosaoxidasou (EC 1.1.3.4) *in vitro* (Dhar *et al.*, 2022).

2.1.2 ROS v imunitě

Role ROS v imunitě včel je v současnosti téměř neprozkoumaná. Ačkoliv jsou imunitní procesy včel intenzivně studovány, mnoho molekulárních procesů spojených s ROS stále není známých. Většina výzkumů zabývajících touto problematikou (a imunitou hmyzu obecně) je zaměřena na octomilky z důvodů rychlého a snadného chovu, a hlavně zvládnutému získávání mutantů. V této práci tedy vycházím z analogie se studii zabývajících se i jinými druhy hmyzu s ortologními enzymy a signalizací.

Narušením redoxní rovnováhy ve střevech včel se zabývali Paris *et al.* (2017). Zajímali je vliv infekce parazitické houby hmyzomorky (*Nosema ceranae*) v kombinaci s insekticidem fipronilem na oxidativní procesy v trávicí soustavě včel. Jednalo se o jednu z prvních prací, ve které měřili nejen abundanci nebo aktivitu antioxidačních enzymů, ale také přímo koncentraci ROS v tkáních včel a jejich oxidativní poškození. Zjistili, že samotná infekce *N. ceranae* vede ke snížení jak hladiny ROS, tak i oxidace proteinů a lipidů. V kombinaci s fipronilem ovšem infekce způsobuje větší oxidativní poškození (je však možné, že je způsobené toxicitou fipronilu). Kromě toho přišli na to, že výskyt oxidativního poškození se zvyšuje s průběhem stárnutí včel, nezávisle na expozici patogenům nebo insekticidu. Nezaměřili se ovšem na aktivitu enzymu Duox, který tvoří z hlediska imunity významný produkt – HClO.

2.1.3 ROS v senescenci

Dřívější předpoklad, že ROS jsou jedním z primárních spouštěčů stárnutí, byl v posledních letech opakovaně vyvrácen. Bylo potvrzeno, že ROS nemají kauzální roli v mitochondriálním stresu (Jang a Remmen, 2009; Lapointe a Hekimi, 2010). Dnes se má za to, že oxidativní stres figuruje v obnově buněk a hraje roli v dlouhověkosti (Ristow a Schmeisser, 2011). Zvýšená hladina ROS je tedy spíše důsledkem stárnutí než jeho důvodem. Záleží ovšem na typu a koncentraci ROS nebo době trvání stresu.

Hsieh a Hsu (2013) srovnávali aktivitu enzymů zapojených v metabolismu ROS v trofocytech a tukových buňkách mladých (2 měsíce) a starých (16 měsíců) včelích matek. Trofocyty jsou buňky tukového tělíska, které se v dospělých jedincích nedělí, a jsou tedy ideální model pro studium senescence. Kromě oxidativního stresu měřili i aktivitu enzymů zapojených do odbourávání ROS – SOD, CAT, glutathionperoxidasy (GPX, EC 1.11.1.9) a thio-redoxinreduktasy (TR, EC 1.6.4.5). Zjistili, že mladé matky vykazují oproti starým v trofocytech sníženou hladinu ROS a aktivitu SOD, CAT a GPX, a naopak zvýšenou aktivitu TR. V průběhu stárnutí se tak zvyšuje jak koncentrace ROS, tak i aktivita antioxidantních systémů. Tyto výsledky naznačují, že právě aktivace mechanismů obrany proti stresu a následná obnova buněk může být jedním z faktorů dlouhověkosti včelích matek.

Na tuto studii Hsu a Hsieh (2014) navázali měřením oxidativního stresu v trofocytech a tukových buňkách právě vylíhlých mladých a 50 dní starých dělnic. Mladé včely vykazovaly zvýšené hladiny ROS. V porovnání se starými včelami měly také zvýšenou expresi SOD a TR, a naopak sníženou expresi CAT a GPX. Oxidativní stres se tedy v průběhu stárnutí dělnic snižuje, pravděpodobně vlivem většího zapojení antioxidantních systémů.

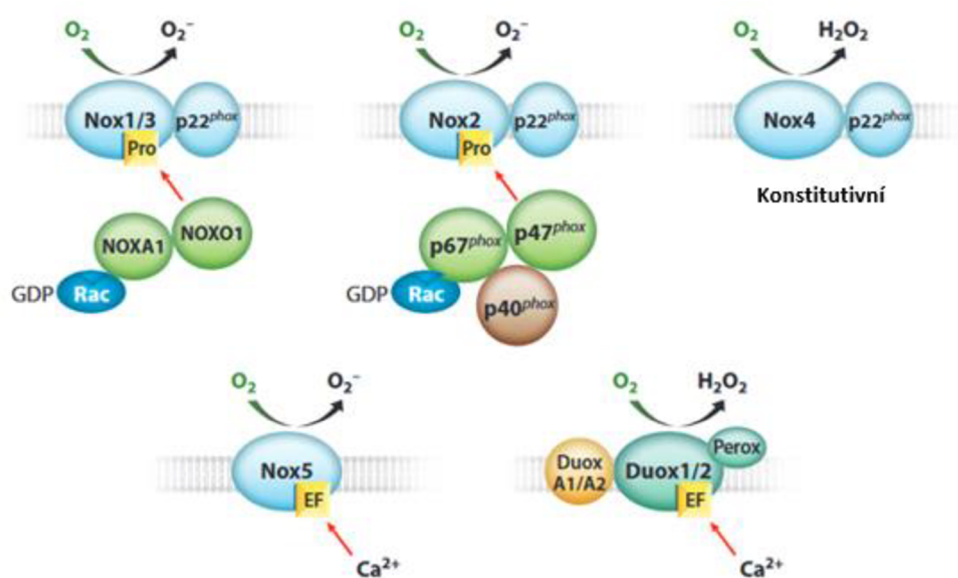
Ke stejnému závěru došli i Słowińska *et al.* (2016) – starší včely vykazují vyšší aktivitu enzymů zapojených do odbourávání oxidativního stresu, což jim může pomoci lépe zvládat oxidativní stres vyvolaný např. pesticidy.

Kramer *et al.* (2021) provedli studii srovnávající působení oxidativního stresu na 4 druhy sociálního hmyzu – 2 druhy včel (*A. mellifera* a *Euglossa viridissima*), termity (*Cryptotermes secundus*) a mravence (*Platythyrea punctata*). Zajímala je korelace mezi oxidativním poškozením a délkou života různých kast – proč dělnice žijí kratší dobu než reprodukcující se matky. Zjistili, že oxidativní poškození proteinů není zvýšené u starších jedinců a je závislé spíše na druhu organismu než kastě. Rozdílná byla také exprese genů podstatných pro antioxidantní aktivitu. Jediným společným trendem byla zvýšená exprese

genu *Sod1* u dělnic a genu *Prx3* (kóduje Prx3 v mitochondriích) u starých jedinců. Závěrem práce tedy bylo, že manifestace stresu a antioxidačních systémů jsou u všech druhů rozdílné, což znesnadňuje generalizaci. Ve studii ovšem používali různé typy tkání a výsledky tedy nejsou jednoznačně interpretovatelné.

2.2 Molekulární vlastnosti Nox/Duox

Enzymy z rodiny Nox/Duox za fyziologických podmínek fungují jako pravděpodobně nejvýznamnější zdroje cílené produkce ROS. Dle současných poznatků rodina živočišných Nox/Duox obsahuje 7 členů – Nox1-5 a Duox1/2. Všechny enzymy z rodiny Nox/Duox jsou schopny oxidovat NAD(P)H a následně přenášet elektrony přes membránu až na O_2 . Hlavní rozdíly mezi jednotlivými enzymy jsou cytoplasmatické podjednotky, způsoby aktivace a vytvářený typ ROS (Obr. 3). Většina Nox vytváří $O_2^{\cdot-}$, zatímco Duox produkují H_2O_2 . Duox navíc obsahují doménu homologní s POX, která může převést vzniklý H_2O_2 na jiné produkty, které mají často vyšší mikrobicidní aktivitu (např. HClO).



Obr. 3: Schématické zobrazení strukturálních komponent enzymů z rodiny Nox/Duox, způsobů jejich aktivace cytoplasmatickými podjednotkami nebo Ca^{2+} a typu tvořených ROS (upraveno podle Lambeth a Neish, 2014).

2.2.1 Struktura Nox/Duox

Celá enzymová rodina Nox/Duox sdílí základní strukturní a funkční vlastnosti, které byly poprvé popsány u Nox2 (ve starší literatuře zvaná také phox – fagocytická oxidasa). Jedná se o vazebná místa pro NAD(P)H a flavinadenin dinukleotid (FAD) na jejich C-koncové doméně a 2 hemové skupiny umístěné v membránové části proteinu. U hmyzu nebyly nalezeny ortologní geny kódující podjednotky Nox/Duox, včely tedy mají pouze Nox5 a jeden typ Duox (Kawahara *et al.*, 2007; Kawahara a Lambeth., 2007). U některých členovců (včetně komárů) byla objevena i isoforma Nox4 – tzv. Nox4-art, která je nezávislá na podjednotce p22-phox. Nebyla ovšem nalezena u octomilek, ani včel (Gandara *et al.*, 2017).

Prvním objeveným enzymem z této skupiny byl Nox2 v lidských fagocytujících buňkách. Nejdůležitější součástí Nox2 je flavocytochrom b558. Jedná se o komplex zakotvený v membráně, který je tvořen větším 65kDa katalytickým glykoproteinem gp91phox (nově nazývaný také Nox2) a menším 22kDa proteinem p22phox, který plní větší množství rolí. Funguje jako vazebné místo pro cytosolické regulační podjednotky, maturační faktor potřebný pro správnou glykosylaci gp91phox a hraje důležitou roli ve stabilizaci celého cytochromového heterodimeru (Nauseef, 2004). Na cytoplasmatickém C-konci proteinu se nachází vazebné domény pro NAD(P)H a FAD. Membránová složka Nox2 je tvořena 6 transmembránovými α -helixy, tato struktura se vyskytuje u všech Nox1-4 (Lambeth, 2004). Na 3. a 5. helixu se dále nachází 2 hemové prostetické skupiny, které jsou vázány mezi 4 histidinové vedlejší řetězce. Elektrony z NAD(P)H tedy v celém komplexu přecházejí nejdříve přes FAD doménu, poté postupně přes obě hemové skupiny, a nakonec na extracelulární O_2 . K celému enzymovému komplexu dále patří 4 cytoplasmatické komponenty důležité ke správné funkci enzymu – p47phox, p67phox, p40phox a GTPasy Rac1 a Rac2 (EC 3.6.5.2) (Geiszt a Leto, 2004; Lambeth, 2004).

První objevený homolog Nox2 byla Nox1, sdílí 56% shodu v sekvenci aminokyselin (564 aminokyselin). Molekulová hmotnost Nox1 byla stanovena na 65 kDa. Nox1 k aktivitě také potřebuje podjednotky p22phox a Rac1. Nox1 se však od Nox2 liší v dalších cytosolických podjednotkách schopných indukovat vyšší produkci $O_2^{\cdot-}$ – patří k němu Nox organizátor 1 (Noxo1, homolog p47phox) a Nox aktivátor 1 (Noxa1, homolog p67phox) (Geiszt *et al.*, 2003). Hlavní rozdíl mezi Noxo1 a p47phox je schopnost kontrolovat aktivitu enzymu. Noxo1 totiž chybí hyperfosforovatelná

autoinhibiční oblast, která se váže k p22phox a membránovým fosfolipidům. Kompletně sestavený Nox1 tak vykazuje konstitutivní aktivitu.

I Nox3 je velikostí 65 kDa, strukturou a podjednotkami podobný Nox2. Nox3 také vykazuje základní aktivitu, která může být dále zvýšena jednou nebo oběma cytosolickými podjednotkami patřícími k Nox1 nebo Nox2.

Nox4 je Nox2 podobná méně – sdílí pouze 39% homologii. Molekulová hmotnost Nox4 je 67 kDa. Ke své stabilizaci a schopnosti produkovat ROS také potřebuje podjednotku p22phox. Zajímavé ovšem je, že z 90 % vytváří přímo H₂O₂ (Nisimoto *et al.*, 2014). Aktivita Nox4 ovšem není ovlivněna žádným z cytosolických partnerů Nox1 a Nox2 (Noxo1, Noxa1, p47phox, p67phox a Rac) (Rada a Leto, 2008). Nox4 jako jediný enzym z rodiny Nox/Duox vykazuje vysokou konstitutivní aktivitu nezávisle na cytosolických podjednotkách.

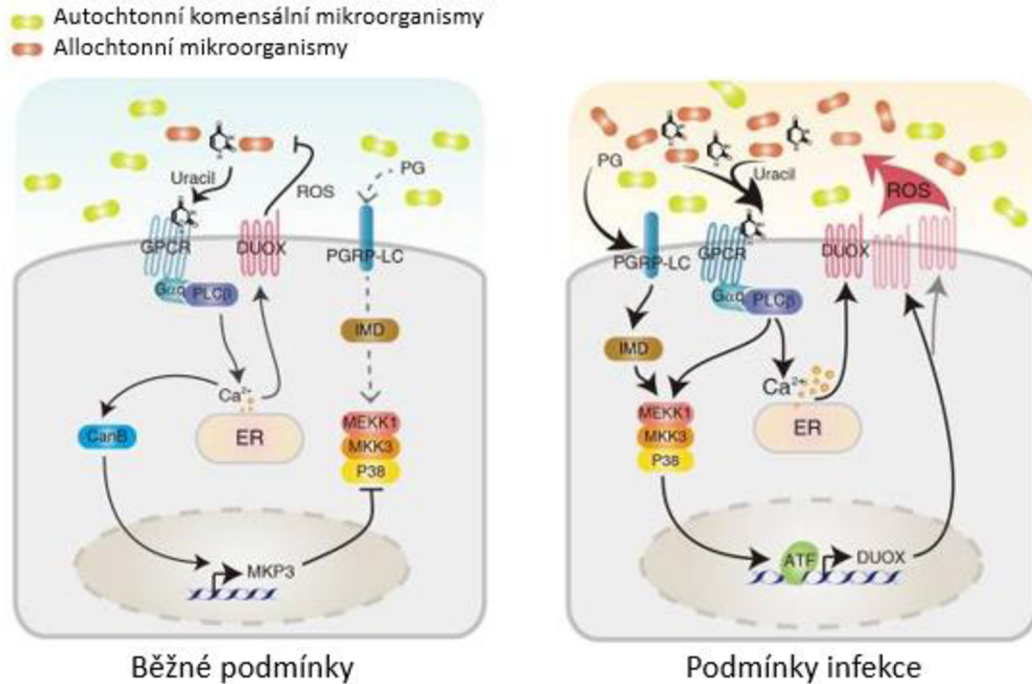
Posledním a nejunikátnějším členem skupiny Nox je Nox5. Molekulová hmotnost je oproti Nox1-4 vyšší – 86 kDa. U lidského Nox5 bylo zjištěno 5 isoformem (Bánfi *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2001). Na rozdíl od ostatních Nox se na cytoplasmatických doménách Nox5 nacházejí 4 motivy tzv. EF-ruky. Jedná se o struktury schopné zachytit Ca²⁺, které fungují jako aktivátor enzymu.

Druhou skupinou této enzymové rodiny jsou Duox1 a Duox2, které jsou nejvíce podobné Nox5. Jedná se o největší proteiny z celé rodiny Nox/Duox – jejich molekulová hmotnost se pohybuje okolo 180 kDa. V sekvenci aminokyselin sdílejí 50% shodu s Nox2 a 83% shodu mezi sebou. Duox ke své aktivitě také nevyžadují p22phox, ale mají 2 esenciální maturační faktory – Duoxa1 a Duoxa2 (De Deken *et al.*, 2002; Ameziane-El-Hassani *et al.*, 2005). Na C-koncích mají struktury podobné dalším Nox – NAD(P)H a FAD domény. Cytosolické oblasti Duox obsahují 2 motivy EF-rukou. Ameziane-El-Hassani *et al.* (2005) zjistili, že lidská Duox2 má 2 stavy N-glykosylace – „částečnou“, kdy produkují O₂⁻, a úplnou, kdy je schopná generovat přímo H₂O₂. Duox1 i 2 mají navíc extracelulární N-koncovou doménu homologní s POX (Rada a Leto, 2008). U hmyzu tato doména vykazuje aktivitu podobnou myeloperoxidase (MPO, EC 1.11.2.2) – tvorbu HClO (Ha *et al.*, 2005). Proto se tento enzym nazývá „duální“ – jedná se o 2 spojené enzymy. Kromě této vlastní domény podobné POX může H₂O₂ vytvořený Duox sloužit jako substrát pro jiné POX. Transmembránový region Duox octomilek a včel obsahuje 7 transmembránových míst (Hu *et al.*, 2013).

2.2.2 Mechanismy regulace exprese a aktivity Nox/Duox

Enzymy z rodiny Nox/Duox se dají dělit také podle způsobu regulace aktivity (Obr. 3). Do první skupiny se řadí Nox1-4, které ke své funkci potřebují podjednotku p22phox. Nox1-3 obsahují vazebnou oblast bohatou na prolin, na kterou se váží cytosolické podjednotky. Enzym Nox4 tuto oblast nemá a je aktivní konstitutivně. Enzymy z druhé skupiny (Nox5, Duox1/2) jsou regulovány intracelulární koncentrací Ca^{2+} , které jsou zachytávány specifickými doménami EF-rukou. Aktivita Nox i Duox (většiny) hmyzu je tedy regulována hladinou Ca^{2+} .

V současnosti jsou známy dva na sobě nezávislé mechanismy, které kontrolují zachování homeostázy v trávicím traktu hmyzu – signalizační dráha „immune-deficiency“ (IMD), která vede k produkci AMP, a Duox (Buchon *et al.*, 2009; Lee a Brey, 2013; Kim a Lee, 2014). Aktivita Duox může být zesílena dvěma mechanismy – přímým zvýšením enzymové aktivity nebo zvýšením genové exprese (Obr. 4). Aktivace Duox je spouštěna uracilem pocházejícím z bakterií, který funguje jako elicitor signalizace „Hedgehog“. Spuštění této dráhy vede ke zvýšení exprese cadherinu 99C (Cad99C). Molekuly Cad99C spolu s fosfolipasou C- β (PLC β , EC 3.1.4.3) a protein kinasou C (PKC, EC 2.7.11.13) indukují tvorbu signalizačních endosomů, které poté spouští uvolnění Ca^{2+} z endoplasmatického retikula (ER) (Lee *et al.*, 2015). Uvolněné Ca^{2+} se vážou na motivy EF-ruky Duox a způsobují změnu konformace, čímž aktivují produkci H_2O_2 (a v přítomnosti chloridů i HClO). Bylo také pozorováno, že pro aktivaci Duox musí být kromě Cad99C v endosomu přítomný také faktor 3 asociovaný s receptorem pro tumor nekrotizující faktor (TRAF3) (Lee *et al.*, 2018). S TRAF3 můžou v aktivaci Duox dále spolupracovat 4 kinasy – AMPK, Warts, ATG1 a MEKK1 (Lee a Lee, 2018). Takto stimulovaná dráha G α q-PLC β - Ca^{2+} tedy zvyšuje enzymovou aktivitu Duox. Kromě této rychlé reakce může také dojít ke spuštění dráhy IMD, která ovlivňuje expresi *Duox*. Bakteriální peptidoglykan (PG) slouží jako signál ke spuštění kaskády mitogenem aktivovaných proteinkinás MEKK1-MKK3-p38 MAPK, která aktivuje kinasu p38. Aktivovaná p38 kinasa (ve střevech isoforma p38c) poté fosforyluje aktivační transkripční faktor 2 (ATF2), který spouští transkripci genu *Duox*. Tato dráha je tak zodpovědná za zvýšení syntézy Duox v odpovědi na rozeznání bakteriálních PG, což vede i k vyšší produkci mikrobiocidní HClO (Ha *et al.*, 2009; Chakrabarti *et al.*, 2014).



Obr. 4: Schéma mechanismu regulace aktivity a exprese Duox v buňkách střevního epitelu za běžných podmínek a při infekci patogenními mikroorganismy (upraveno podle Kim a Lee, 2014). Vysvětlení zkratk dosud se nevyskytujících v textu práce: Gαq – G-protein; GPCR – receptor spřažený s G-proteinem; PGRP – receptorový protein rozpoznávající peptidoglykan.

Imunita založená na aktivaci Duox je vysoce energeticky náročná, účastní se jí prokatabolická a antianabolická signalizace. Snížení lipogenese, která spotřebovává NADPH a zvýšení lipolysy, při které se NADPH naopak tvoří, je podstatné k dosažení co nejvyšších koncentrací NADPH nutných k udržování aktivity Duox. Lee *et al.* (2018) prokázali, že octomilky mutantní v AMPK/WTS-ATG1 signalizační dráze exprimovaly nízkou aktivitu Duox. Tato dráha je aktivována TRAF3 a vede k lipolyse. Mutantní mušky tedy měly sníženou hladinu NADPH, které slouží jako substrát pro Duox, a byly tak více náchylné k infekcím. Ve stejné studii ukázali, že po infekci patogeny je MEKK1 (aktivující expresi genu *Duox*), také zapojena do indukce lipolysy mediované ATF-3. Imunitní dráha Duox tedy vede k vyšší produkci jak tohoto enzymu, tak i jeho substrátu.

2.2.3 Lokalizace Nox/Duox

Subcelulárně se katalytická část enzymů z rodiny Nox/Duox nachází především v plasmatické membráně buněk, regulační podjednotky se vyskytují v cytoplasmě (Panday *et al.*, 2015). Lokalizace v membráně umožňuje uvolňování ROS do extracelulárního prostoru, což je důležité při imunitních reakcích v trávicím traktu nebo ve fagocytujících buňkách.

Komplexní analýza Duox bource morušového (*Bombyx mori*), kterou provedli Hu *et al.* (2013), ukázala, že exprese *Duox* probíhá v podstatě v celém organismu. Za fyziologických podmínek byla pozorována vyšší abundance v hlavě, pohlavních orgánech a vzdušnicích; nižší abundance pak v trávicí soustavě, hemocytech, Malpighických trubicích, vaječnicích a tukových tělískách. Po inokulaci patogenními bakteriemi a viry byla signifikantně zvýšena exprese v trávicí soustavě, protože právě zde dochází k prvním imunitním reakcím.

Kromě *Duox* se ve střevech nachází také druhý enzym produkující ROS – *Nox*. Iatsenko *et al.* (2018) zjistili, že aktivita *Nox* octomilek je ve střevech závislá na přítomnosti laktobacilů. Bakteriální laktát je oxidován enzymem laktátdehydrogenasou (LDH, EC 1.1.1.27) na pyruvát za vzniku NADH, které slouží jako substrát pro *Nox*.

Expres obou typů oxidas (*Nox* i *Duox*) je odlišná v různých oblastech trávicí soustavy a typech buněk (Dutta *et al.*, 2015). To by mohl být jeden z důvodů, proč NADH vzniklé oxidací laktátu ve střevech zvyšuje tvorbu ROS pouze enzymem *Nox*, ačkoliv může sloužit jako substrát pro oba typy enzymů (Iatsenko *et al.*, 2018). Lokalizace *Nox/Duox* v trávicí soustavě včel nebyla studována, ale vzhledem k nízké abundanci bakterií v žaludku se zdá, že může být analogická octomilkám – tedy výskyt *Duox* v oblasti s nízkým počtem komensálních bakterií a *Nox* v oblasti osídlené laktobacily.

2.3 Role *Nox/Duox* v imunitě a signalizaci

Enzymy z rodiny *Nox/Duox* tedy hrají velmi důležitou roli v interakci živočichů s mikroorganismy ve střevech a zajišťování homeostázy. Jak komensální bakterie, tak i patogenní mikroorganismy jsou při kontaktu s buňkami střevního epitelu schopny vyvolat antimikrobiální odpovědi (Patel *et al.*, 2013). *Nox/Duox* mohou být aktivovány mikrobiálními elicitory, což zvýší jejich aktivitu. V závislosti na signálu poté *Nox/Duox* přispívají buď k eliminaci patogenů, nebo k signalizaci vedoucí k obnově buněk střevního epitelu (při styku se symbionty). V takovém případě se po nedestruktivním poškození aktivuje produkce cytokinů, které podporují tvorbu nových střevních buněk.

Střevní epitel v podstatě všech živočichů funguje jako bariéra proti mikroorganismům a má zachované imunitní odpovědi na střetnutí s bakteriemi (vrozená imunita) – eliminovat škodlivé patogeny a zachovat symbiotické komensální bakterie (Hoffmann a Reichhart, 2002). Právě komensální symbiotické bakterie jsou velmi přínosné, protože hostiteli můžou poskytovat živiny. Včely vyžadují vysoké množství vitaminů

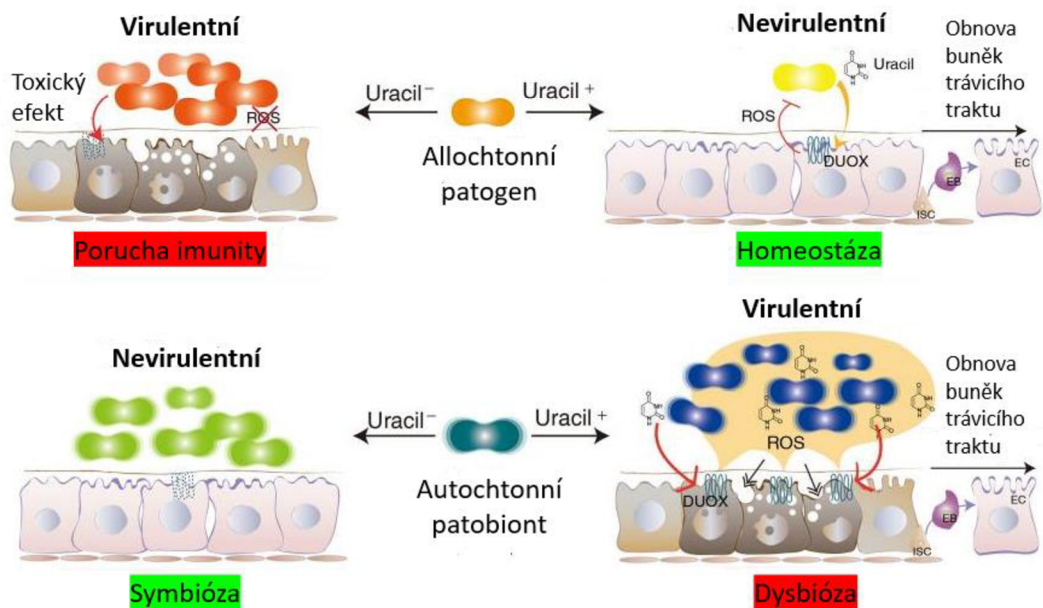
ze skupiny B, které nejsou schopny samy syntetizovat, a získávají je právě od střevních bakterií (Dadd, 1973; Salem *et al.*, 2014).

Má se za to, že obecně je první obrannou reakcí produkce mikrobicidních ROS enzymem Duox. Vysoké hladiny ROS (u hmyzu specificky HClO) působí během infekcí trávicího traktu jak proti komensálům, tak proti patogenům (Obr. 5). Kontrolovaně v malých koncentracích ovšem ROS (převážně H₂O₂) působí jako signální molekuly, které jsou zapojeny do mnoha různých buněčných procesů včetně proliferace buněk trávicí soustavy (Lambeth a Neish, 2014).

Dále dochází k produkci efektorových molekul. Mezi nejvýznamnější patří, kromě ROS, také tvorba AMP, z nichž většina může být aktivována 2 různými signalizačními drahami v závislosti na složení molekulárních vzorů asociovaných s patogeny (PAMP). AMP ovšem nevznikají přímo ve střevech, ale převážně v tukovém tělísku – funkčním analogu jater živočichů (Gätschenberger *et al.*, 2013). První je dráha Toll, která je spouštěna jako reakce na patogenní houby a Gram-pozitivní (G⁺) bakterie (Gallo a Hooper, 2012; Buchon *et al.*, 2013). Známé transkripční faktory zapojené do této dráhy jsou Toll-1 a dorsal (Evans *et al.*, 2006). Druhou signalizační drahou je IMD, kterou spouští PG z G- bakterií, a která vede k aktivaci transkripčního faktoru Relish (Hoffmann a Reichhart, 2002, Chakrabarti *et al.*, 2014). Aktivace IMD je umožněna receptorovými proteiny rozpoznávající peptidoglykan (PGRP) – v trávicím traktu a tukovém tělísku se jedná především o PGRP-LC a PGRP-LE. Dráhy IMD a Toll se navíc vzájemně překrývají (De Gregorio *et al.*, 2002). V případě, že patogenní mikroorganismy proniknou přes epiteliální bariéru do hemolymfy dochází ke koagulaci hemolymfy a melanizaci.

U bourců morušových byla potvrzena korelace mezi zvýšenou hladinou ROS, které pravděpodobně slouží mikrobicidně i jako signalizační molekuly, se zvýšenou koncentrací NO a AMP v dalších fázích bakteriální infekce (Zhang *et al.*, 2015).

U octomilek bylo zjištěno, že signalizace mediovaná H₂O₂ spouští produkci oxidu dusnatého NO indukci transkripce genu *NO-syntasy* (*NOS*, EC 1.14.13.39) (Wu *et al.*, 2012). NO dále slouží jako signál v reakci na G- bakterie a předpokládá se, že aktivuje IMD dráhu, čímž spouští expresi AMP (Nappi *et al.*, 2000; Foley a O'Farrell, 2003).



Obr. 5: Schéma různých fyziologických stavů v trávicí soustavě hmyzu v závislosti na schopnosti mikroorganismů vylučovat uracil (uracil^{-/+} pro uracil nevylučující a vylučující) a osídlit trávicí trakt (allochtonní/autochtonní) (upraveno podle Kim a Lee, 2014).

Tyto signální a imunitní dráhy jsou složkou vrozené imunity, která je u živočichů konzervovaná, a dá se tedy očekávat, že podobným způsobem funguje i imunita včel.

Zimní období, kdy jsou všechny včely v úlu, je ideální k přenosu a množení patogenů. Předpokládá se, že právě během něj vznikají rozdíly v chování a imunitním systému včel, které charakterizují mladé a staré zimní včely. Právě tímto fenoménem se zabývali Ratiu *et al.* (2016), když srovnávali expresi genů zapojených v imunitě u mladých a starých zimních včel. Zjistili, že exprese mnoha důležitých genů je změněna – staré včely vykazují zvýšenou expresi genů *Dorsal* a *Relish* a sníženou expresi *Toll-1*. Exprese genu *Duox* však nebyla signifikantně změněna, jelikož je závislá především na výskytu patogenů.

Lewkowski *et al.* (2022) při studiu nemoci hniloby včelího plodu způsobené bakterií *Melissococcus plutonius* zjistili, že v larvách dochází ke snížení exprese genů *Duox* a *pirk* (inhibitor IMD). Změna imunitního systému je pravděpodobně přirozený proces přípravy na metamorfosu. Snížená exprese *pirk* vede k vyšší expresi AMP. Naopak snížení exprese *Duox* vede k snížení tvorby ROS, a tedy i oxidativního poškození tkání larev během jejich restrukturalizace.

2.3.1 Hemocyty

Důležitost ROS ve vrozené imunitě živočichů byla poprvé pozorována ve fagocytyjících neutrofilech. Po jejich aktivaci imunitními stimuly v nich dochází k masivní spotřebě O_2 , který je aktivitou Nox/Duox přeměňován na $O_2^{\cdot-}$, který může být spontánně nebo enzymově dismutován na H_2O_2 (jedná se také o přímý produkt Duox). Ten může dále fungovat jako signální molekula či být přeměněn na jiné mikrobicidní produkty.

Hemocyty hmyzu jsou buňky strukturně i funkčně podobné savčím neutrofilům – rozpoznávají patogeny a usmrcují je procesem zvaným fagocytosa. Mikrobicidní aktivita je zajištěna produkcí $O_2^{\cdot-}$ enzymy z rodiny Nox/Duox a uvolněním proteolytických enzymů z fagocytů, tzv. degranulací (Browne *et al.*, 2013). Hemocyty se vyskytují volně v hemolymfě, ale mohou se také vázat na vnitřní orgány jako je třeba tukové tělísko nebo trávicí trakt (Kavanagh a Reeves, 2004). Množství hemocytů v hemolymfě se v průběhu života hmyzu mění nejen při infekci patogenními organismy, ale také během stárnutí (Bergin *et al.*, 2003).

K aktivitě hemocytů je nezbytná opsonizace mikroorganismů. Tu zajišťují, stejně jako u savců, komplementu podobné proteiny (Tojo *et al.*, 2000). Po pohlcení patogenu hemocytem dochází k aktivaci membránových enzymů z rodiny Nox/Duox vedoucí k tvorbě mikrobicidních ROS do lumenu hemocytu. Ty využívají elektrony získané z cytoplasmatického NAD(P)H k redukci extracelulárního O_2 za vzniku $O_2^{\cdot-}$. Tento proces je známý jako respirační či oxidativní vzplanutí. Bylo zjištěno, že v lidských neutrofilech je doprovázeno vznikem HClO, což je produkt MPO (Albrett *et al.*, 2018). Předpokládá se, že v hemocytech včel ve fagocytose hrají roli právě Duox, jejichž doména podobná POX vykazuje stejnou aktivitu jako MPO (Richardson *et al.*, 2018).

Bergin *et al.* (2005) studovali produkci $O_2^{\cdot-}$ v hemocytech zavíječe voskového (*Galleria mellonella*). Zjistili, že produkce $O_2^{\cdot-}$ a následná mikrobicidní aktivita byla inhibována inhibítorem flavoenzymů difenyljenjodoniem (DPI). Analýza metodou Western blot hemocytů s protilátkami proti lidským gp91phox, p67phox, p47phox a rac2 ukázal přítomnost homologních enzymů. Nebyl ovšem nalezen protein podobný p40phox. Tyto výzkumy se ovšem neshodují s pozdější genetickou analýzou, kterou provedli Kawahara a Lambeth (2007). Ti u hmyzu našli enzymy ortologní pouze k Nox5 a Duox1, které ovšem nemají podjednotky popsané ve studii Bergin *et al.* (2005).

Richardson *et al.* (2018) dále zjistili, že produkce ROS v hemocytech včel může být stimulována aktivátorem PKC – forbol 12-myristát 13-acetátem (PMA). To naznačuje přítomnost PKC-dependentního systému fagocytické oxidasy.

Kromě fagocytosy figurují hemocyty ještě ve dvou důležitých imunitních procesech – nodulaci a enkapsulaci. K nodulaci dochází, když se více hemocytů naváže na shluk bakterií a obklopí je. Nodulace je dokončena aktivací profenoloxidasy (EC 1.10.3.2) a melanizací nodulí, čímž dojde k eliminaci velkého množství patogenních mikroorganismů najednou (Lavine a Strand, 2002). Enkapsulace je reakce na vniknutí „velkého“ organismu (např. prvoka, vajíček nebo larev roztočů) do hemolymfy (Strand a Pech, 1995). Enkapsulace může probíhat dvěma způsoby podle řádu hmyzu – u motýlů (*Lepidoptera*) tento proces zajišťuje imunita buněčná, zatímco u řádu dvoukřídlých (*Diptera*) ji zprostředkovává převážně humorální složka. K humorální enkapsulaci může dojít bez i s hemocyty, vždy je do ní ovšem zapojena fenoloxidasa a následná melanizace. Výsledkem enkapsulace je vytvoření tzv. kapsuly kolem patogena (Schmit a Ratcliffe, 1978; Cho a Cho, 2019).

Ayyaz *et al.* (2015) na octomilkách prokázali, že hemocyty hrají roli v regeneraci buněk trávicího traktu a udržení homeostázy bariérového epitelu. Hemocyty podobné makrofágům jsou schopny regulovat kmenové buňky trávicího traktu (ISC). Po poškození tkání střev dochází ke shromáždění hemocytů v místě infekce a sekreci látek, které vedou k aktivaci ISC. Interakce mezi hemocyty a ISC dále vede k rezistenci vůči patogenům, ale u starších včel vede k dysplasii (poruše, při které často dojde k expanzi nezralých buněk).

U hmyzu bylo popsáno 8 typů hemocytů: prohemocyty, plasmacyty, granulární buňky, koagulocyty, krystalové buňky (z anglického „crystal cells“), sferulocyty, oenocytoidy a thrombocytoidy (Pandey a Tiwari, 2012). Jednotlivé druhy hmyzu ovšem nemají všechny typy hemocytů.

Na rozdělení a rozlišování jednotlivých typů hemocytů včel se vědci v současné chvíli nemohou shodnout, hlavním problémem je nejednotné pojmenování nalezených struktur. V současnosti jsou proto vyvíjeny referenční markery k určení subtypů hemocytů včel (Gábor *et al.*, 2020). U larev i dělnic byly v jednotlivých studiích rozlišeny různé typy hemocytů podle histochemického značení, velikosti a morfologických znaků – fagocytické granulární buňky, plasmacyty, oenocytoidy, koagulocyty, binukleární buňky, permeabilizované buňky a prohemocyty (El-Mohandes *et al.*, 2010; Negri *et al.*, 2014; Richardson *et al.*, 2018). Jako nejabundantnější typ včelích hemocytů byly popsány fagocytické granulocyty (Richardson *et al.*, 2018).

2.3.2 Role Duox v trávicím traktu

Ha *et al.* (2005) ukázali, že tvorba ROS je v trávicím traktu octomilek první obrannou reakcí po infekci patogenními bakteriemi. Zjistili, že expozice patogenním G- bakteriím vede k tvorbě ROS pouze enzymem Duox a ne Nox. Lee *et al.* (2013) dále objevili, že aktivita Duox v trávicím traktu octomilek je stimulována uracilem vylučovaným G- bakteriemi. Hachfi *et al.* (2019) prokázali, že Duox vytváří mikrobicidní HClO zhruba 0,5-1,5 h po infekci patogeny (resp. vystavení uracilu). Redoxní rovnováhu zajišťuje extracelulární CAT, která odbourává potenciálně škodlivé zůstatky H₂O₂ v lumenu střev.

Kromě octomilek a včel byly provedeny zajímavé studie také na komárech tropických (*Aedes aegypti*), kteří přenášejí prvoka *Plasmodium*, který vyvolává malárii, a virová onemocnění způsobující žlutou zimnici nebo horečku dengue. Pochopení jejich fyziologie může vést k vývoji účinných prostředků k redukci jejich počtů nebo nemocí, které mohou přenášet.

Oliveira *et al.* (2011) se věnovali přítomnosti bakterií ve střevech komárů. Komensální bakterie totiž mohou působit jako antagonisté lidských patogenů, pro které jsou komáři pouze přenašeči. Objevili, že ROS jsou neustále přítomné ve střevech komárů krmených cukrem, ovšem při krevní stravě jejich hladina ihned klesá. Dále zjistili, že je to způsobené přítomností hemem mediované aktivace PKC, která tak může vést nejen k aktivaci, ale i inhibici Duox. Společně s krmením krví dochází k expanzi bakterií v trávicím traktu. Inhibice Duox tedy očekávaně vedla k snížení hladiny ROS a nárůstu střevního mikrobiomu. Absence tvorby ROS u komárů vystavených bakteriím vedla ke snížení rezistence k infekci, zvýšení poškození v trávicím traktu, změně transkripce genů zapojených v imunitě a zvýšení mortality. V závěru navrhli, že kontrolované snížení hladiny ROS ve střevech komárů je adaptací na přítomnost hemu. Hem je prooxidativní molekula, která vzniká ve vysoké koncentraci degradací hemoglobinu. Je schopný reagovat s hydroperoxydy za tvorby cytotoxických produktů a pro organismus komára je tedy výhodnější snížit hladinu ROS, než podstupovat zátěž v podobě oxidativního poškození lipidů.

Azzouz-Olden *et al.* (2018) zjistili, že v případě infekce včel houbou hmyzomorkou včelí (*N. apis*) dochází stejně jako u octomilek k zvýšení exprese genů kódujících Duox a AMP. To znamená, že tyto prvky imunitního systému dobře popsané u octomilek jsou podstatné i pro včely. Dále také pozorovali, že tyto konzervované imunitní reakce nejsou závislé na kvalitě stravy včel. Je totiž známo, že krmení včel náhražkami pylu, které jsou nutričně méně hodnotné, způsobuje náchylnost včelstev k chorobám.

Duox a jejich mikrobicidní produkt – HClO, nemají roli pouze v přímé eliminaci patogenních organismů ve střevech. Další strategií obrany proti mikrobům je zrychlení defekace, a tudíž i rychlejší vylučování patogenů. Tímto způsobem se zkrátí doba vystavení potenciálně škodlivým procesům, ať už vlivem patogenu nebo imunity. Du *et al.* (2016) provedli na octomilkách výzkum, ve kterém se zaměřili na nemikrobicidní funkce HClO. Zkoumali evolučně konzervovaný receptor na reaktivní chemikálie TRPA1(A), který se nachází ve střevě, a povedlo se jim prokázat jeho roli v urychlení defekace spouštěné aktivitou Duox. Společně s tím ukázali, že patogenní bakterie *E. carotovora*, které aktivují Duox vylučováním uracilu, vykazovaly vyšší perzistenci v trávicím traktu octomilek deficientních v genu *TrpA1*. Zajímavé také bylo, že bakterie v takto postižených jedincích přežily tvorbu HClO ve střevech. To potvrzuje, že k efektivnímu fungování imunity a udržení homeostázy je třeba provázanost mnoha na sebe navazujících procesů. Uracilem aktivované Duox tedy eliminují bakterie nejen přímo mikrobicidní aktivitou, ale spouští také jejich vylučování skrz receptor citlivý na jejich produkt – HClO.

Chmiel *et al.* (2019) se zabývali vlivem neonikotinoidových insekticidů na imunitní systém octomilek. Zdá se totiž, že subletální dávky těchto látek mají vliv nejen na škůdce, ale i na imunitní systém opylovačů (Doublet *et al.*, 2015). Předpokládá se, že tak mohou stát za úbytkem včelstev nejen v Severní Americe. Nejpoužívanější neonikotinoid imidacloprid byl nalezen na více než polovině ovoce a zeleniny v USA a Číně, a také v 51 % vzorků medu z celého světa (Mitchell *et al.*, 2017; Lu *et al.*, 2018). Neonikotinoidy mají vliv na imunitní procesy ve střevech hmyzu vedoucí ke snížené obraně k patogenům. Zjistili, že expozice subletálním dávkám imidaclopridu vede k narušení dráhy IMD, konkrétně ve střevech se vyskytujícího receptoru PGRP-LE, a následně ke snížení exprese *Duox*. Toto narušení regulace střevního mikrobiomu vedlo ke zvýšení abundance bakterií ve střevech. Naopak presuplementace probiotickými bakteriemi alespoň částečně zabraňuje efektu imidaclopridu.

2.3.3 Role Nox v trávicím traktu

U většiny druhů hmyzu byl nalezen jediný gen ortologní s *Nox* – *Nox5*. V současnosti se má za to, že je *Nox5* zapojen do vyprazdňování střev a signalizace především při obnově buněk. Biologická role *Nox5* v prokontraktilních procesech trávicí soustavy byla prokázána nejen na modelovém organismu – octomilkách, ale také na hmyzích škůdcích

sajících krev z čeledi zákeřnicovitých (*Rhodnius prolixus*), kteří stejně jako včely endogenně exprimují Nox5.

Ritsick *et al.* (2007) prokázali působení Nox v regulaci kontraktlních procesů u octomilek. Uvolnění ROS enzymem Nox souvisí se zvýšením koncentrace Ca^{2+} , což vedlo ke kontrakcím hladkého svalstva v ovariích. Naopak octomilky s Nox umlčeným metodou RNA interference (RNAi) vykazovaly zadržování zralých vajíček v ovariích, způsobené sníženými kontrakcemi hladkého svalstva. Také se u nich rozvinula sterilita způsobená pravděpodobně narušenou regulací Ca^{2+} .

Montezano *et al.* (2018) na modelu *R. prolixus* mikroskopicky prokázali, že isoforma Nox5 je nezbytná ke kontrakcím hladkého svalstva ve střevech. Navíc zjistili, že po vystavení *R. prolixus* potravě dochází ke zvýšení exprese Nox5. Naopak po umlčení genu pro Nox5 došlo k zastavení kontrakcí svalů. Při použití inhibitoru VAS2870, který je specifický pro Nox1/2/4, ovšem nedošlo ke snížení kontrakcí. Tento inhibitor tedy pravděpodobně není specifický pro Nox5.

Gandara *et al.* (2021) na tento výzkum navázali a zjistili, že střevní peristaltika je pod ranou kontrolou nejen Nox5, ale také dalších enzymů. V této studii se zaměřili na enzym nacházející se v hemolymfě – xanthindehydrogenasu (XDH, EC 1.1.1.204), která je zapojená do metabolismu ROS, a v případě přeměny na xanthinoxidasu (EC 1.17.3.2) může vytvářet $O_2^{\cdot-}$. Kromě toho také figuruje v metabolismu dusíku, jehož finálním produktem je u hmyzu kyselina močová. Genetické umlčování jednoho z Nox5 a XDH měnilo expresi druhého enzymu. Také vedlo, kromě narušení peristaltiky, ke snížení trávení hemoglobinu, produkce vajíček a koncentrace kyseliny močové v hemolymfě, která u *R. prolixus* pravděpodobně hraje roli v regulaci trávení krve.

Všechny tyto procesy zahrnují hladké svalstvo, jehož základ je v mezodermu. Tento vývoj je u živočichů konzervovaný. Dá se tedy předpokládat, že procesy způsobené Nox5 v určité míře fungují také u včel a lidí.

Iatsenko *et al.* (2018) publikovali, že octomilky nesoucí mutovaný gen pro extracelulární receptor PGRP-SD vykazují dysbiózu (změnu složení mikrobiomu) a zkrácenou délku života. PGRP-SD pomáhá zprostředkovávat bakteriální PG enzymu PGRP-LC, a takto mutované octomilky tedy nejsou schopny reagovat na přítomnost PG tvorbou AMP, což vede k přemnožení bakterií, včetně komensálních rodu *Lactobacillus*. Je totiž narušena signalizační dráha IMD, která významně reguluje homeostázu trávicího traktu. To samo o sobě není pro organismus přímo škodlivé, laktobacily však produkují nadměrně laktátu, který nepřímo spouští produkci ROS v trávicím traktu. Laktát je

v enterocytech oxidován LDH na pyruvát za vzniku NADH, které slouží jako substrát pro Nox. Zvýšená koncentrace ROS následně způsobuje dysplasi střevního epitelu, ale zároveň nevede k eliminaci bakterií. Nox totiž chybí doména podobná POX, která by H_2O_2 vzniklý dismutací O_2^\cdot přeměnila na mikrobicidní HClO. Zajímavé také je, že laktobacily indukují pouze aktivitu Nox a nikoliv Duox. Je známo, že Duox jsou elicitovány bakteriálním uracilem a jejich hlavní role spočívá v mikrobicidních reakcích. Iatsenko *et al.* (2018) se tedy domnívají, že laktobacily hrají roli v obnově buněk střevního epitelu založené na oxidativním stresu způsobeném aktivitou Nox. Je ovšem důležité, aby růst laktobacilů byl regulovaný – zvýšená exprese PGRP naopak zabraňuje dysbióze a prodlužuje délku života octomilek. Tento způsob produkce ROS je konzervovaný – má tedy velký význam pro pochopení vztahu hostitel-mikrobiom nejen u včel, ale i u lidí.

2.3.4 Nox/Duox v signalizaci a obnově buněk

Obecně se má za to, že komensální bakterie jsou v trávicím traktu pro hostitele prospěšné. Bylo zjištěno, že kompetují s patogeny a hrají roli v obnově buněk střevního epitelu (Jones *et al.*, 2013, Buchon *et al.*, 2013). V kontrastu k patogenům se o stimulaci obnovy střevních buněk symbiotickými bakteriemi ví relativně málo. Tento efekt byl pozorován v podstatě jen pro G^+ bakterie rodu *Lactobacillus*, které stimulují produkci ROS nepřímým poskytnutím substrátu pro Nox střevních enterocytů (Iatsenko *et al.*, 2018). Tyto ROS (pravděpodobně H_2O_2) dále aktivují ISC, ze kterých vznikají nové enterocyty a enteroendokrinní buňky (Buchon *et al.*, 2013).

Jones *et al.* (2013) zjistili, že octomilky s Nox umlčenou metodou RNAi po inokulaci laktobacily vykazovaly nižší produkci ROS. Zjistili také, že v tvorbě ROS po této inokulaci nehrají roli Duox. Kromě toho také došlo v reakci na ROS k navýšení replikace DNA, což je jeden ze znaků proliferace a obnovy buněk, v tomto případě střevního epitelu. Jones *et al.* (2013) tedy předpokládají, že stabilní nízká koncentrace ROS funguje jako signál pro tvorbu nových enterocytů.

Buchon *et al.* (2009) pozorovali, že kromě mikrobicidní aktivity mají ROS produkované Duox také schopnost vyvolat proliferaci ISC. Tento způsob však souvisí s poškozením střevního epitelu vysokými koncentracemi ROS, které jsou vytvořeny v rámci imunitní reakce. Indukce obnovy buněk je tedy vyvolána nepřímo prostřednictvím odpovědi na stres. V tomto případě ROS reagují se stresem aktivovanými kinasami JNK, které jsou schopny indukovat proproliferativní cytokiny z rodiny

Leptin/IL-6. Tyto cytokiny posléze aktivují signalizaci JAK/STAT (Janus kinasy/STAT transkripční faktor) v ISC, což podporuje jejich růst, proliferaci a celkově zrychluje obnovu střevního epitelu (Buchon *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2009).

Další předpokládané mechanismy zahrnují možnost, že ROS v nízké koncentraci spouští proliferaci ISC přímo. Komensální laktobacily vyvolávají tvorbu ROS pouze v enzymech Nox a ne Duox, které vykazují mikrobicidní aktivitu schopnou poškozovat buňky. Takto vzniklý H₂O₂ nezpůsobuje poškození střev a působí jako signál pro buňky střev, aniž by došlo ke spuštění stresových a obranných drah vedoucích k usmrcení mikroorganismů (Jones *et al.*, 2013). Poslední možnost počítá s tím, že symbiotické bakterie způsobují „zdravou“ dávku poškození střev, čímž v nich stimulují obnovu.

Ať už je obnova buněk závislá na poškození nebo ne, bylo zjištěno, že do proliferace ISC buněk je zapojen cytokin Upd3, což bylo potvrzeno u komensálních i patogenních mikroorganismů (Buchon *et al.*, 2009). Rozdíl mezi patogeny a symbionty je tedy, alespoň v některých procesech, spíše v rozsahu jejich působení, než kvalitativních rozdílech (Patel *et al.*, 2013).

Dias *et al.* (2013) potvrdili další roli Duox ve fyziologických procesech hmyzu – v tvrdnutí vnějšího vaječného obalu („hmyzího chorionu“). U *R. prolixus* prokázali aktivitu Duox v ovarích, kde vytvořený H₂O₂ následně sloužil jako substrát pro POX, která zprostředkovala zesíťování proteinů (dityrosinaci) v chorionu, což vedlo k jeho ztvrdnutí. To je důležité pro zvýšení odolnosti proti poškození nebo vysychání embryí.

Role Duox v zesíťování proteinů dityrosinací v různých tkání hmyzu je pravděpodobně konzervovaný proces. U komára *Anopheles gambiae* H₂O₂ produkované Duox slouží k zesíťování proteinů v peritrofické vrstvě lumenálního epitelu střev, což limituje difúzi elicitorů uvolněných z mikroorganismů do hemolymfy (Kumar *et al.*, 2010). U octomilek bylo dále zjištěno, že Duox působí v tvrdnutí kutikuly křídel. H₂O₂ je totiž potřebný ke sklerotinizaci, melanizaci a zesíťování tyrosinů (Anh *et al.*, 2011).

2.5 Přehled metod stanovení aktivity Nox/Duox

Enzymy z rodiny Nox/Duox jsou významným zdrojem O₂^{•-} a H₂O₂ jak pro redoxní signalizaci, tak i pro oxidativní poškození často zaměřené vůči patogenům. K pochopení těchto procesů je vhodné využívat látky modulující jejich aktivitu. V současnosti se k inhibici Nox/Duox stále běžně používají látky jako apocynin a DPI, ačkoliv nejsou specifické a mohou inhibovat i další enzymy (Herb *et al.*, 2021). Existuje však také celá

řada specifických inhibitorů Nox/Duox, které fungují *in vivo* i *in vitro*, např. VAS2870 nebo GKT137831 (Leusen *et al.*, 1995; Laleu *et al.*, 2010). K identifikaci rolí Nox/Duox v těchto procesech je kromě specifických inhibitorů vhodné použít také mutace genů nebo RNAi (Murphy *et al.*, 2022). To však je u organismů se složitou reprodukční biologii a genetikou jako jsou včely stále poměrně náročné.

Produktem aktivity Nox je $O_2^{\cdot-}$, který může být dále převeden na peroxynitrit, hydroperoxydy nebo dismutován na H_2O_2 , což je přímý produkt Duox. Kvůli svým vlastnostem, jako je nižší reaktivita a průchodnost biologickými membránami, je H_2O_2 formou ROS nejvhodnější k signalizaci. Může být také převeden POX doménou Duox na HClO, která hraje v trávicím traktu důležitou roli v obraně proti patogenům. Z těchto důvodů se tato práce zaměřuje na metody stanovení aktivity Nox/Duox sledováním produkce právě H_2O_2 a HClO.

V jednoduchých systémech může být H_2O_2 měřen metodou oxidace fluorescenčních sond křenovou peroxidasou (HRP, EC 1.11.1.7). Vzhledem k tomu, že je H_2O_2 schopný procházet membránami přímo nebo přes aquaporiny, dá se tato metoda využít i k měření peroxidu uvolněného z buněk, což je hlavní případ tvorby ROS ve střevech (v případě měření za nativních podmínek). Nevýhodou těchto metod je možnost nespecifické oxidace, zapojení antioxidačních systémů nebo možná interference s dalšími substráty HRP (např. askorbát). To může vést k nepřesným měřením obzvláště v homogenátech. Dalším problémem metod s HRP je interference $O_2^{\cdot-}$, který může ve větší koncentraci inaktivovat HRP. $O_2^{\cdot-}$ však samovolně dismutuje, popř. lze odstranění $O_2^{\cdot-}$ urychlit přidávkou SOD k reakci (Kettle *et al.*, 1994).

2.5.1 Kvantifikace produkce ROS

Tato práce se věnuje stanovení aktivity Nox/Duox, tedy tvorbě $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 a HClO, dvěma různými metodami – fluorimetricky a histochemicky.

Ke kvantifikaci produkce H_2O_2 se běžně využívají oxidovatelné próby v přítomnosti HRP. Tyto metody ovšem mohou ve frakcích tkání a různých enzymů zapojených do redoxního metabolismu často přinášet nepřesné a nespecifické výsledky.

V současnosti nejběžnější a nejvíce využívanou sondou je pravděpodobně AmplexRed (AR; N-acetyl-3,7-dihydroxyfenoxazin), v praktické části této práce jej srovnávám se staršími próbami – kyselinou homovanilovou (HVA; 3-methoxy-4-hydroxyfenyloctová kyselina) a skopoletinem (7-hydroxy-6-methoxy-2H-1-benzopyran-2-on). Oxidace skopoletinu vede ke snížení fluorescence, naopak oxidace HVA a AR

fluorescenci zvyšuje – tyto metody jsou tedy obecně senzitivnější. Všechny próby byly původně používány k měření aktivity Nox2 ve fagocytech, ale dají se využít i k detekci H₂O₂ produkovaného dalšími Nox a Duox. Nauseef (2014) uvádí, že přesná detekce H₂O₂ pomocí těchto metod vyžaduje přidavek SOD, protože O₂^{•-} může reagovat s próbou, což následně může ovlivnit reakci próby s H₂O₂ a vést ke snížení fluorescenčního signálu.

V případě fluorimetrického stanovení se měří přímo hladina určitých ROS v homogenátu biologického vzorku, nebo se izolují proteiny z požadované tělní části či tkáně hmyzu. Získané enzymy mohou být následně inkubovány s NADPH a látkami ovlivňujícími jejich aktivitu. Po ukončení první inkubace proběhne druhá s fluorescenční próbou a HRP, která reakcí s H₂O₂ oxiduje próbou na produkt se změněnou fluorescencí, která se následně kvantifikuje. Fluorimetrické metody jsou sice schopné přesně změřit koncentraci ROS, avšak aktivita Nox/Duox je takto stanovena nepřímo využitím spřažené reakce s HRP. K přesnější kvantifikaci tvorby ROS enzymy Nox/Duox by bylo vhodné využít metodu RNAi a následně naměřené hodnoty porovnat se vzorky s nenarušenou transkripcí.

Pro specifitější stanovení aktivity Duox *in vivo* se také dají využít histochemické metody s využitím moderních sond – v současnosti je při práci s hmyzem využívána próba R19S, jelikož ve střevech specificky reaguje přímo HClO (produkt Duox). Získané výsledky se poté dají analyzovat určením intenzity a rozsahu zjištěné fluorescence ve střevech.

Další běžně využívanou próbou vhodnou i k mikroskopii, kterou ale v této práci nepoužívám, je CM-H₂DCFDA. Ta může být oxidovaná všemi ROS (tedy i těmi nevyužívanými v imunitě), popř. jinými redoxními enzymy. V přítomnosti O₂^{•-} je ovšem náchylná k zacyklení redoxní reakce, která vede k uměle zvýšenému výtěžku fluorescence (Kalyanaraman *et al.*, 2012).

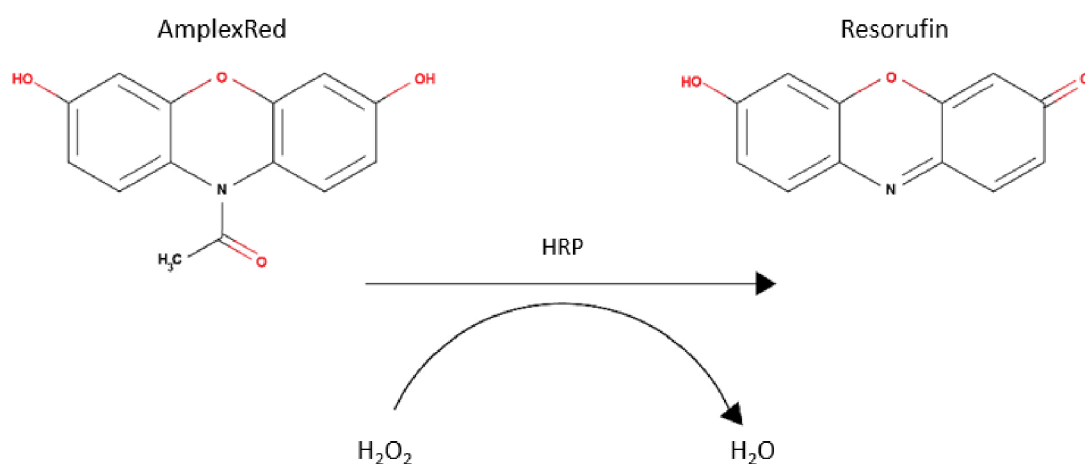
Jinou moderní možností kvantifikace ROS je HPLC analýza produktů oxidace dihydroethidia (DHE), což je indikátor O₂^{•-} (Oliveira, 2011). DHE se dá použít také jako fluorimetrický substrát pro stanovení aktivity enzymů produkujících O₂^{•-}.

2.5.1.1 Metoda s AR

Oxidace AR peroxidem vodíku v přítomnosti HRP probíhá ve stechiometrii 1:1. Tato reakce je nevratná a tvoří se při ní růžově zbarvený resorufin, vykazující specifickou fluorescenci při excitačním maximu 563 nm a emisi 587 nm (Obr. 6) (Zhou *et al.*, 1997). Detekce se tedy dá stanovovat jak spektrometricky, tak i citlivější fluorimetrickou

metodou. U té se jako spodní hranice detekce H_2O_2 uvádí 5 pmol, limit kvantifikace je pak 30 pmol (Zhou *et al.*, 1997). Výrobce spektrofotometru Synergy HT (BioTek), který byl použitý v experimentální části práce, uvádí detekční limit 400 fmol H_2O_2 v jedné jamce mikroleštičky. Porovnáním naměřených výsledků se standardní křivkou definovaných koncentrací H_2O_2 v přítomnosti AR a HRP je možno vypočítat koncentrace vzniklého H_2O_2 (Nauseef, 2014). Hlavními problémy této metody jsou její nekompatibilita s redukčními činidly (např. dithiotreitol, merkptoethanol), nutnost zachování úzkého rozmezí pH 7-8 a především fotooxidace AR vzhledem k excitaci vlnovými délkami viditelného světla.

V práci vycházím z metody použité Dias *et al.* (2013), kteří provedli měření produkce H_2O_2 zprostředkované Duox v tkáních *R. prolixus*. V prvním experimentu kultivovali tkáň v Tyrodově roztoku (náhrada fyziologického prostředí) při 25 °C 60 min s AR a HRP. Aktivita Duox je závislá na přítomnosti Ca^{2+} , vzorky byly tedy předtím inkubovány s ionomycinem (ionofor Ca^{2+} – zvyšuje jejich koncentraci) a bez něj, s BAPTA/AM (chelátor Ca^{2+} - snižuje jejich koncentraci) nebo obojím po dobu 10 min při 28 °C. Inhibice aktivity Duox byla dosažena inkubací s DPI. Po inkubaci byly vzorky zcentrifugovány a následně byl odebrán supernatant. Fluorescence nespecifické (nezávislé na H_2O_2) oxidace AR byla určena při absenci HRP a sloužila jako blank. Fluorescence byla měřena v mikroleštičkovém spektrofotometru při excitaci 530 nm a emisi při 590 nm.



Obr. 6: Schéma mechanismu oxidace AR na fluoreskující resorufin po oxidaci katalyzované HRP v přítomnosti H_2O_2 (upraveno podle Karakuzu *et al.*, 2019).

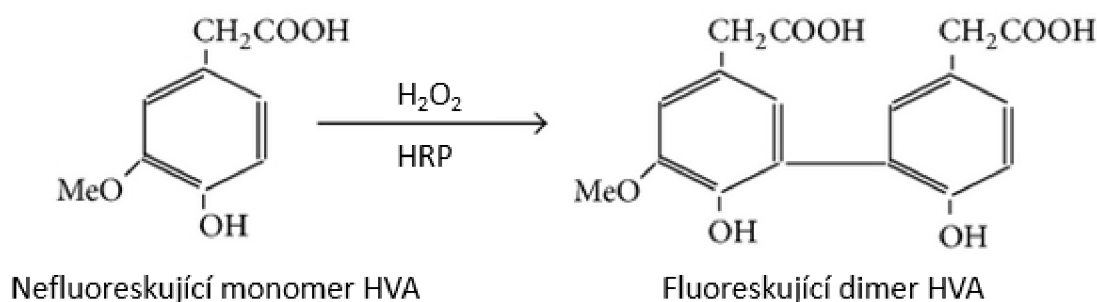
Chmiel *et al.* (2019) vynechali první inkubaci s látkami ovlivňujícími aktivitu Nox/Duox a rovnou kvantifikovali koncentraci H_2O_2 v celém organismu. Nejprve homogenizovali tři celé octomilky v PBS pufru, poté homogenát centrifugovali a v supernatantu měřili koncentraci H_2O_2 relativní k množství proteinů ve vzorku.

Oliveira *et al.* (2011) kvantifikovali koncentraci H_2O_2 tak, že celé čerstvě odebrané trávicí soustavy *A. aegypti* (vždy po 10 orgánech) po promytí inkubovali ve tmě v PBS pufru společně s AR a HRP. Po 30 min vzorky centrifugovali a v odebraném supernatantu měřili fluorescenci, jako blank sloužila nespecifická oxidace AR v nepřítomnosti HRP.

2.5.1.2 Metoda HVA

Stejně jako AR, může i HVA sloužit jako oxidovatelný substrát pro HRP za přítomnosti H_2O_2 . Nefluoreskující monomery HVA oxidací vytváří fluorescenční dimer, který vykazuje maximum excitace při vlnové délce 315 nm a emise při 425 nm (Obr. 7). Výhodou této próby je excitace v UV spektru, což výrazně omezuje fotooxidaci a je tedy možné s proubou pracovat při běžném osvětlení. Další výhodou může být vysoká chemická stabilita dimeru HVA, uvádí se více než 12 h (Paital, 2014). Nevýhodou metody s HVA je možná oxidovatelnost jinými oxidasami a POX než HRP, např. metaloporfyriny (Ci a Wang, 1991).

V této práci vycházím z protokolu zavedeného Ruch *et al.* (1983). Ti využili metodu s HVA pro měření koncentrace H_2O_2 produkované fagocytickými lidskými buňkami. V protokolu využili PBS pufr obsahující Ca^{2+} a Mg^{2+} . Produkci ROS navodili přidavkem PMA k 50 μ l buněčné kultury, které následně 5-120 min inkubovali při 37 °C společně s 50 μ l HVA a 50 μ l HRP. Následně reakci zastavili přidavkem stop pufru (0,1M glycin/NaOH s EDTA, pH 12). Kromě zastavení reakce došlo také k posunu pH do zásaditější oblasti, ve které má dimer HVA vyšší fluorescenci.



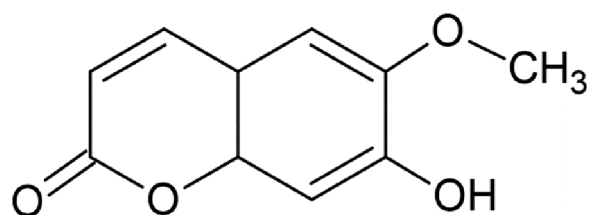
Obr. 7: Schéma mechanismu oxidace monomeru HVA na fluoreskující dimer po oxidaci katalyzované HRP v přítomnosti H_2O_2 (upraveno podle Paital, 2014).

Martyn *et al.* (2006) provedli měření extracelulární produkce H_2O_2 transfekovaných lidských buněčných kultur nesoucích gen pro Nox4. Do každé jamky destičky bylo umístěno $1-3 \times 10^5$ buněk. Následující den byly buňky promyty PBS puforem a poté do každé jamky přidali 1-2 ml roztoku HVA s HRP v PBS s Ca^{2+} a Mg^{2+} . Následně byly buňky inkubovány při $37\text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 30-120 min. V dalším kroku byl přidán stop pufr k zastavení reakce a úpravě pH. Fluorescence byla vyvolaná excitací při 312 nm, emise měřena při 420 nm.

Paital (2014) přinesl modifikaci metody s HVA. Proteiny z biologických vzorků před fluorimetrickým měřením nejprve precipitoval v 5% trichloroctové kyselině, následovanou neutralizací K_2HPO_4 . Precipitace proteinů zabránila reakcím katalyzovaným enzymy, které jsou zapojené do redoxního metabolismu. Po těchto modifikacích naměřil hodnoty až 2x vyšší než v nemodifikovaných vzorcích.

2.5.1.3 Metoda se skopoletinem

Skopoletin je rostlinný kumarin s přirozeně vysokou fluorescencí ve vodných roztocích (Obr. 8) (Pham *et al.*, 2020). Na rozdíl od předchozích prób se při oxidaci skopoletinu jeho fluorescence snižuje. V práci vycházím z protokolu zavedeném Ginabreda *et al.* (2008), kteří vzorky frakcí z požadované tkáně inkubovali při $30\text{ }^\circ\text{C}$ v Na-fosfátovém pufru (pH 7,4) obsahujícím azid sodný, EGTA, FAD a $CaCl_2$. Reakce byla započata přidavkem NADPH do reakční směsi. Poté byly každých 20 min sbírány poměrné části (aliquoty), které byly následně smíchány s HCl. Tím došlo k zastavení reakce a odstranění zbývajícího NADPH, které vykazuje fluorescenci v podobných vlnových délkách jako skopoletin. Skopoletin je excitován při 360 nm a světlo emituje při 460 nm. Kvůli snižování fluorescence při oxidaci byly hodnoty koncentrací vzniklého H_2O_2 z aliquotů vypočteny odečtením z úbytku fluorescence za přítomnosti HRP ve fosfátovém pufru (pH 7,8). Specifická aktivita byla následně vyjádřena na mg celkových proteinů – nmol H_2O_2 /h/mg proteinu.



Obr. 8: Chemický vzorec skopoletinu. Vytvořeno v programu ChemSketch.

2.5.2 Využití R19S pro histochemickou detekci HClO

Poslední metodou detekce ROS, která je využita v této práci je histochemická detekce HClO próbou R19S. Jedná se rhodaminový derivát, který reaguje s HClO za vzniku fluoreskujícího produktu R19 (Obr. 9) (Chen *et al.*, 2011). Albrett *et al.* (2018) při testování specifity R19S došli k závěru, že tato próba rychle reaguje i s dalšími reaktivními sloučeninami obsahujícími halogeny – např. HBrO, bromaminy nebo HIO. Nereaguje však s H₂O₂, ani s dalšími zástupci ROS, což je podstatné pro specifitu R19S jako próby pro histochemickou detekci mikrobicidního produktu Duox – HClO.

Chen *et al.* (2016) využili пробу R19S pro histochemickou detekci HClO ve střevech octomilek. Detekovali tedy aktivitu Duox. V prvním kroku byly po dobu 2 h při 25 °C ponechány mušky v prázdných plastových dózách bez potravy, aby došlo k vyhladovění a následné synchronizaci krmení. Dále byly mušky přeneseny do plastových dóz na kultivaci obsahujících filtrační papír nasáklý roztokem sacharosy s *Ecc15* (*E. carotovora carotovora* 15) pro orální infekci. Zde byly mušky 30 min při 25 °C a poté byly přeneseny do dózy obsahující filtrační papír nasáklý roztokem sacharosy s *Ecc15* a R19S. Zde se krmily po dobu 1 h při 25 °C. Následně byly mušky uspány CO₂ a poté byla z mušek odpitvána střeva (ideálně do 30 s, aby se zamezilo vysvícení fluoroforu), která byla následně zafixována v 4% paraformaldehydu po dobu 10 min při 25 °C. Každý vzorek střev byl následně promyt (2x5 min) v roztoku PBS vychlazeném na ledu. Mikroskopické pozorování bylo provedeno na konfokálním mikroskopu. V přítomnosti HClO se R19S mění na fluorescenční R19. Při excitační vlnové délce 514 nm vykazuje maximální emisi v oblasti 530-603 nm (jako maximum se uvádí 550 nm).

Hachfi *et al.* (2019) zajímala časová osa aktivace Duox a tvorby HClO. Vycházeli ze stejného protokolu, ale postupovali tak, že vyhladovělé mušky nejprve 30 min krmili sacharosou s bakteriemi a R19S. Část z nich poté odebrali k přípravě preparátů, a část mušek přenesli do dózy obsahující pouze sacharosu s R19S. Tyto mušky následně odebírali co 30 min k pozorování výskytu HClO v trávicí soustavě.

3 Experimentální část

3.1 Materiál

3.1.1 Chemikálie

Acros (Thermo Fisher Scientific, USA): difenylenjodonium chlorid, ethylendiamintetraoctová kyselina, nikotinamidadenindinukleotidfosfát

Lachema (Česká republika): hydroxid draselný, hydroxid sodný.

Lach-Ner (Česká republika): dimethylsulfoxid, ethanol, formaldehyd, chlorid draselný, chlorid hořečnatý, chlorid sodný, kyselina fosforečná, kyselina octová, peroxid vodíku.

Penta (Česká republika): dihydrogenfosforečnan draselný, chlorid vápenatý, kyselina chlorovodíková

Serva (Německo): křenová peroxidasa.

Sigma-Aldrich (Německo): acetonitril, dihydrát fosforečnanu disodného, glycin, homovanilová kyselina, chlorid vápenatý, hovězí sérový albumin, methylviologen dichlorid hydrát (paraquat), skopoletin, superoxiddismutasa (z hovězích erythrocytů), uracil.

Synchem OHG (Německo): AmplexRed

Syntézu R19S provedl doc. RNDr. Miroslav Soural, Ph.D. z Katedry organické chemie PŘF UPOL.

3.1.2 Přístroje a vybavení

Analytické váhy (Sartorius, Německo)

Automatické pipety (Eppendorf, Německo)

Digitální pH metr InoLab pH level1 (Inolab, Německo)

Digitální předvážky (Radwag®, Polsko)

Elektromagnetická míchačka (IKA, Německo)

Epifluorescenční mikroskop Axio Imager M2 (Carl Zeiss, Německo)

Homogenizátor Retsch MM 400 (Retsch, Polsko)

Chlazená centrifuga 5418 R (Eppendorf, Německo)

Inkubační lázeň Dry Bath Incubator (Major Science, USA)

Inkubovaná třepačka TS-100 (BioSan, Lotyšsko)

Konfokální mikroskop LSM 710, Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Německo)

Mikrodestičkový spektrofotometr Reader Synergy H1 (BioTek Instruments, USA)

Mikrodestičkový spektrofotometr Reader Synergy HT (BioTek Instruments, USA)

Mikrodestičky Test plate 96F (TPP, Švýcarsko)

Stereomikroskop binokulární (Bel Engineering, Itálie)

Stolní Ultracentrifuga Himac CS150NX (Hitachi, Japonsko)

Vortex mixer (Stuart, UK)

3.1.3 Biologický materiál

Včely medonosné používané k experimentům pocházely ze soukromých chovů prof. Mgr. Marka Petřivalského, Dr. a Mgr. Jiřího Danihlika, Ph.D..

3.1.4 Příprava zásobních roztoků

K fluorimetrickému stanovení koncentrace H_2O_2 v biologických vzorcích byly připraveny následující roztoky:

- **Zásobní 50mM K-fosfátový pufr** (pH 7,0): bylo smícháno 6,15 ml 1M K_2HPO_4 a 3,85 ml 1M KH_2PO_4 a doplněno ddH₂O do objemu 200 ml a upraveno na pH 7;
- **Zásobní PBS pufr** (pH 7,4): bylo smícháno 1,6 g NaCl, 40 mg KCl, 386 mg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a 49 mg KH_2PO_4 a doplněno ddH₂O do objemu 200 ml a upraveno na pH 7,4;
- **Stop pufr** (0,1M glycin/NaOH + EDTA, pH 12): bylo smícháno 0,7507 g glycinu s 0,93 g disodné soli EDTA a doplněno ddH₂O do objemu 100 ml a upraveno NaOH na pH 12;
- **HRP** (20 U·ml⁻¹): navážka 0,2 mg HRP (aktivita 1000 U·ml⁻¹) byla rozpuštěna v 10 ml PBS, část rozpipetována na alikvoty po 200 μl a zamražena při -20 °C;
- **Zásobní roztok H_2O_2** : byl připraven postupným ředěním koncentrovaného 8800mM H_2O_2 zásobním K-fosfátovým nebo PBS pufrem (v závislosti na metodě) na koncentraci 200 mM, ze které byly připraveny standardy;
- **10mM AR**: 1,3 mg AR bylo rozpuštěno v 0,5 ml DMSO, rozpipetováno na alikvoty po 60 μl a zamraženo při -20 °C;
- **2mM HVA**: 0,73 mg bylo rozpuštěno ve 2 ml PBS pufru;
- **4mM skopoletin**: 0,768 mg bylo rozpuštěno v 1 ml DMSO;
- **5mM NADPH**: 0,83 mg tetrasodné soli NADPH bylo rozpuštěno v 0,2 ml ddH₂O;
- **SOD** (500 U·ml⁻¹): navážka 0,17 mg SOD (aktivita 30000 U·ml⁻¹) byla rozpuštěna v 10 ml PBS, rozpipetováno na alikvoty po 50 μl a zamraženo při -20 °C;
- **1mM DPI**: 0,31 mg bylo rozpuštěno v 1 ml ddH₂O.

K histochemickému stanovení aktivity Duox v trávicích soustavách včel byly připraveny následující roztoky:

- **Zásobní PBS pufr** (viz výše);
- **Fixační roztok** (4% formaldehyd v PBS pufru): 10,8 ml 37% formaldehydu bylo doplněno PBS pufrem na 100 ml;
- **1mM R19S**: 0,43 mg bylo rozpuštěno v 1 ml 100% acetonitrilu;
- **1mM DPI** (viz výše);
- **10mM uracil**: 1,12 mg bylo rozpuštěno v 1 ml ddH₂O;
- **Lipopolysacharidy 300 µg·ml⁻¹** (LPS z *Escherichia coli*): 300 µg bylo rozpuštěno v 1 ml ddH₂O;
- **2,5mM PQ**: 0,64 mg bylo rozpuštěno v 1 ml ddH₂O.

3.2 Metody

3.2.1 Přechování včel a jejich expozice elicitorům

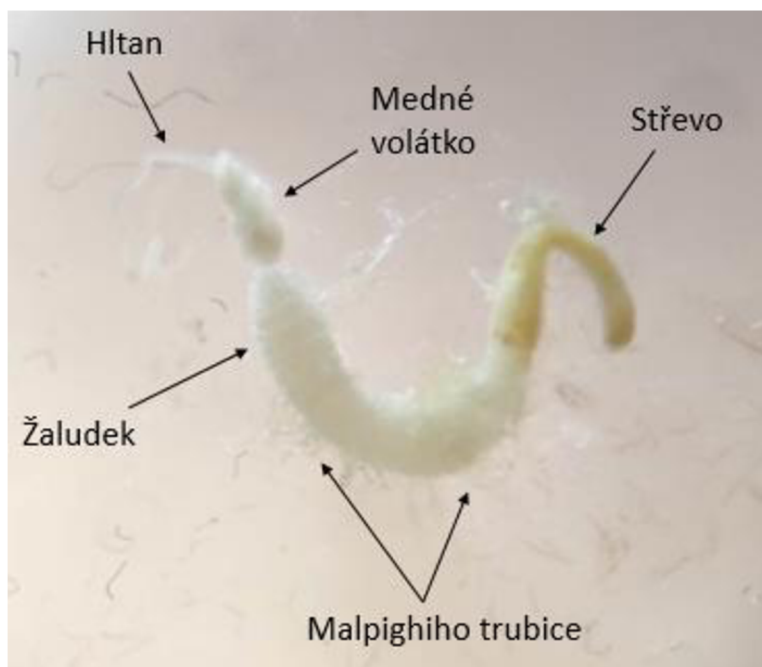
Všechny včely použité k experimentům byly přechovávány ve speciálně upraveném inkubátoru v plastových klíčkách při 37 °C. Včely byly krmeny 50% sacharosou z plastových injekčních stříkaček připevněných do klíček.

Pro fluorimetrická měření koncentrace H₂O₂ byly použity letní včely vylíhnuté v laboratoři o definovaném stáří 1-2, 2-3 a 4-5 d. V případě ovlivnění elicitory byly do sacharosy přidány LPS o finálních koncentracích 15, 30 a 60 µg·ml⁻¹ a PQ o koncentracích 25 a 50 mM. Je známo, že LPS spouští imunitní reakci, neví se však, jestli i tvorbu ROS; PQ je naopak známý induktor oxidativního stresu. Včely, kterým byly podávány LPS, byly odebírány po 24 a 48 h od začátku krmení sacharosou s LPS. Vzhledem k nedostatku 4-5d včel byly pro toto stáří ustanoveny pouze dvě skupiny – kontrolní a vystavená LPS o koncentraci 30 µg·ml⁻¹. Včely krmené sacharosou s PQ byly odebírány po 2, 4 a 8 h. Pro experiment s PQ byly použity pouze včely staré 1-2 d. Krmení s LPS a PQ bylo po celou dobu dostupné v klíčkách. V každém časovém bodě byly včely v klíčce uspány vystavením CO₂ po dobu 1-2 min a cca 20 včel bylo odebráno a zamraženo v tekutém dusíku.

3.2.2 Příprava vzorků ze včel pro fluorimetrická měření

Ze skupiny imunitně neovlivněných včel používaných pro optimalizaci a srovnání fluorimetrických metod (včetně vzorků použitých k ultracentrifugaci) byl používán pouze žaludek se střevem bez výkalového váčku (Obr. 10). Pro následující experiment srovnání

koncentrace H_2O_2 ve včelách krmených LPS a PQ byly použity celé trávicí soustavy. Izolace trávicí soustavy se provádí pinzetou „vytažením“ posledního článku zadečku i s jeho obsahem. Dále používané tkáně byly poté zváženy a rozetřeny v třecí misce uložené na ledu. V průběhu tření byl do misky přidán pufr ve dvojnásobném množství (ml) k hmotnosti včel (g). Následně bylo pipetou odebráno co největší množství uvolněné tekutiny do jednotlivých mikrozkušavek. Poté byly vzorky dvakrát centrifugovány po dobu 10 min při 16000 RCF a 4 °C, pro druhou centrifugaci byl použit supernatant z první. Po druhé centrifugaci byl odebrán supernatant, který sloužil jako biologický vzorek. Připravené homogenáty byly během následující práce uchovávány na ledu a mezi měřeními v mrazáku při -20 °C.



Obr. 10: Fotografie použité části trávicí soustavy (bez výkalového váčku) pozorované binokulárním stereomikroskopem. Oranžové zbarvení ve střevě je způsobené pylem.

3.2.3 Příprava vzorků k ultracentrifugaci

Ke srovnání měření aktivit Nox/Duox sloužila i frakce membránových proteinů získaná ultracentrifugací. Z imunitně neovlivněných včel bylo vypreparováno 0,5 g žaludků se střevy. Ty byly následně promyty v PBS pufru a rozděleny do 2ml mikrozkušavek Eppendorf po 0,25 g. V průběhu práce byly biologické vzorky po celou dobu uchovávány na ledu nebo v chlazených přístrojích. Do každé mikrozkušavky byl přidán 1 ml vychlazeného PBS pufru a cca 10 homogenizačních skleněných kuliček. Následně byly vzorky 5 min homogenizovány v homogenizátoru Retsch MM 400 při 4 °C. Poté byly ponechány cca 20 min od stát na ledu za občasného promíchání na třepačce. Následně byly vzorky centrifugovány při 10000 RCF po při 4 °C po dobu 45 min. Supernatant byl přenesen do ultracentrifugační kyvety a kyvety byly vyváženy na setiny g. Poté byly vzorky centrifugovány v stolní ultracentrifuze Himac CS150NX při 203000 RCF a 4 °C po dobu 60 min pro separaci membránové frakce. Supernatant byl odstraněn a pelet (membránové proteiny) rozsuspendován v 200 μ l vychlazeného PBS pufru. V takto připravených vzorcích byl následně stanoven obsah proteinů a enzymová aktivita Nox/Duox.

3.2.4 Stanovení celkového obsahu proteinů Bradfordovou metodou

Ke stanovení obsahu proteinů v biologických vzorcích byla použita modifikovaná metoda s měřením absorbance při 590 a 450 nm podle Zora a Selinger (1996), která linearizuje naměřené hodnoty. Měřením pouze při 590 nm se může stát, že při vyšších koncentracích proteinů dochází ke zploštění kalibrační přímky.

3.2.4.1 Příprava pracovního roztoku Bradfordova činidla

Zásobní roztok Coomasie Brilliant Blue byl připraven předem na Katedře biochemie rozpuštěním 50 mg Coomasie Brilliant Blue G250 v 25 ml 100% methanolu, 50 ml 85% H_3PO_4 a doplněn ddH₂O na 100 ml. Pracovní roztok Bradfordova činidla byl připraven následným naředěním zásobního roztoku Coomasie Brilliant Blue v poměru 1:4 s ddH₂O.

3.2.4.2 Příprava standardů hovězího sérového albuminu (BSA)

Nejprve byl přichystán zásobní roztok rozpuštěním BSA v ddH₂O do koncentrace 2000 μ g·ml⁻¹. Následným ředěním z něj byla připravena kalibrační řada standardů o koncentracích 1-5-10-25-50-75-100-250-500-1000 μ g·ml⁻¹.

3.2.4.3 Postup měření absorbance

Vždy do 3 jamek 96jamkové průhledné mikrodestičky bylo postupně pipetováno 45 μl ddH₂O, 5 μl blanku (ddH₂O), standardu nebo biologického vzorku a 200 μl pracovního roztoku Bradfordova činidla. Vzhledem k vysoké absorbanci byly biologické vzorky před měřením 10x zředěny ddH₂O. Po napipetování jednotlivých roztoků byla destička mírně protřepána pro promíchání vzorků a ponechána v klidu cca 10 min, během kterých se vyvíjelo zbarvení. Případné bubliny vzniklé při pipetování byly před samotným měřením odstraněny propíchnutím špendlíkem. Následně byla změřena absorbance při 590 a 450 nm na mikrodestičkovém spektrofotometru PowerWave XS. Průměr ze všech 3 jamek (triplikát) sloužil jako 1 měření. Dále byl sestaven kalibrační graf závislosti podílu hodnot získaných z poměru absorbancí při 590/450 nm (osa y) na koncentraci standardů (osa x). Grafem byla proložena lineární regrese a vypočítána rovnice kalibrační přímky. Z kalibrační rovnice a změřené absorbance byla následně spočítána koncentrace proteinů v jednotlivých biologických vzorcích, pomocí ředícího faktoru pak byla vypočítána celková koncentrace proteinů v daném vzorku.

3.2.5 Fluorimetrická kvantifikace H₂O₂

V experimentální části práce byly srovnávány 3 fluorescenční próby (AR, HVA a skopoletin) využívané ke stanovení koncentrace H₂O₂ ve vzorcích metodou spřažené enzymové reakce s HRP. Při srovnávání jednotlivých prób byly provedeny 2 po sobě následující reakce – nejprve inkubace homogenátu s látkami ovlivňujícími aktivitu Nox/Duox a následně reakce HRP s próbou pro stanovení koncentrace H₂O₂ ve vzorku. Reakce s próbou a HRP byla provedena i zvlášť (bez inkubace) pro zjištění nativní koncentrace H₂O₂ ve vzorcích.

3.2.5.1 Příprava standardů H₂O₂ pro kalibrační křivky fluorimetrických metod

K fluorimetrickým měřením obvykle stačí menší koncentrace H₂O₂, jelikož jsou tyto metody velmi citlivé – např. metodu s AR, při níž se tvoří růžově zbarvený fluoreskující resorufin, lze vyhodnotit také měřením absorbance, ovšem citlivost je zhruba o dva řády nižší. Ze zásobního 100 μM roztoku H₂O₂ tak byly pro všechny próby připraveny standardy pro kalibrační křivku v rozsahu koncentrací 0,1-0,5-0,75-1-2,5-5-10 μM .

3.2.5.2 Reakce ovlivňující aktivitu Nox/Duox

Jako biologický materiál při srovnávání prób byl použit homogenát z žaludků a střev imunitně neovlivněných zimních včel o nedefinovaném stáří. Tkáně byly před

zamražením v tekutém dusíku promyty v PBS pufru. Homogenát s PBS pufrům a látkami ovlivňujícími aktivitu Nox/Duox byl inkubován v mikrozkuřavce Eppendorf v inkubované třepačce po dobu 30 min při 30 °C a 300 RPM v celkovém objemu 2 ml. Inkubace byla provedena bez a s přířavkem substrátu Nox/Duox – NADPH o finální koncentraci 0,2 mM. V dalších provedených reakcích byly k biologickému vzorku kromě NADPH dále přidávány také DPI (finální koncentrace 0,05 mM) nebo SOD (finální aktivita 5 U·ml⁻¹). Celkově tedy bylo v mikrozkuřavce 50 μl biologického vzorku (při zředění 40x), 1870 μl PBS pufru a 80 μl 5mM NADPH. V případě přidání SOD nebo DPI bylo přidáno 20 μl SOD (aktivita 500 U·ml⁻¹) a 100 μl 1mM DPI. V těchto případech byl objem PBS pufru menší o objem přidávaných látek. V případě nutnosti ředit biologický vzorek bylo analogicky přidáno menší množství vzorku a větší množství pufru. Kromě kontroly s DPI byly dále použity vzorky denaturované 10 min při 95 °C před i po inkubaci. Po 30 min byly mikrozkuřavky s reakční směsí přeneseny na led pro zpomalení reakce před následující reakcí s próbou a HRP. Pro srovnání byla koncentrace H₂O₂ ve vzorku měřena i v neinkubovaných vzorcích. Aktivita Nox/Duox vzorků proteinů membránové frakce získané z ultracentrifugace byla stanovena stejným způsobem. Vzorky včel ovlivněných LPS a PQ byly inkubovány pouze s NADPH.

3.2.5.3 Stanovení H₂O₂ metodami s AR, HVA a skopoletinem

Pro samotnou reakci próby s HRP za přítomnosti H₂O₂ bylo do 3 jamek 96jamkové černé mikrodestičky pipetováno vždy 50 μl biologického vzorku, standardu nebo blanku. V dalším kroku bylo k biologickým vzorkům nebo standardům napipetováno 50 μl reakčního činidla. Jedná se o roztok HRP o aktivitě 20 U·ml⁻¹ a fluorescenční próby. Vzhledem ke srovnávání a optimalizaci metod byla zvolena stejná hodnota aktivity HRP, v tomto případě nejvyšší vyhledaná v literatuře (udávaná v protokolu Ruch *et al.*, 1983). Finální koncentrace AR byla 50 μM, HVA 100 μM a skopoletinu 2 μM (Tab. 1). Pro jednu 96jamkovou destičku je potřeba 5 ml reakčního činidla – zásobní roztok 10mM AR byl ředěn 100x, 2mM HVA 10x a 4mM skopoletin 1000x v roztoku HRP. Z důvodu velké spotřeby HRP a využití pouze metody s AR byl pro měření vzorků ovlivněných PQ a LPS použit roztok HRP o finální aktivitě 1 U·ml⁻¹ (hodnota publikovaná v Dias *et al.*, 2013), adekvátně k němu byla připravena kalibrační přímka. Jako blank sloužil při měření standardů zásobní pufr, k biologickým vzorkům pak byla přidána pouze próba bez HRP – měřená fluorescence je tedy způsobena nespecifickou oxidací próby. Vzorky se poté nechaly inkubovat 10 min ve tmě při laboratorní teplotě, v této reakci dochází k oxidaci

fluorescenčních prób. Ke skopoletinu bylo po 10 min přidáno 20 μ l stop pufru pro posunutí pH do zásadité oblasti, ve které fluoreskuje. Pro následné měření fluorescence byl použit spektrofotometr Synergy HT. Na počítači byla v programu GEN5 nastavena citlivost a excitační a emisní vlnové délky. Hodnota citlivosti měření byla pro každou próbu nastavena automaticky podle fluorescence standardu s nejvyšší koncentrací H_2O_2 a byla použita pro všechna následující měření.

Pro metodu s AR byla excitace nastavena na 560 nm a emise na 587 nm. Fluoreskující resorufin však většina prací stanovuje měřením fluorescence při excitaci 530 nm a emisi 590 nm. Excitační maximum resorufinu se ale udává při 563 nm, bylo tedy ověřeno i excitační spektrum – jako vzorek byl použit 1 μ M standard H_2O_2 . Koncentrace dimerů HVA byla měřena při excitační vlnové délce 312 nm a emisi 420 nm. Úbytek fluorescence skopoletinu byl měřen excitací vlnovou délkou 360 nm a emisi v 460 nm.

Získané hodnoty fluorescence (RFU) ve 3 jamkách byly zprůměrovány, triplikát sloužil jako 1 technické opakování (n). Získaná fluorescence byla přepočítána z rovnice lineární regrese kalibrační přímky na koncentraci H_2O_2 a vynásobena faktorem ředění na celkovou hodnotu. Výsledné hodnoty koncentrace H_2O_2 byly vztaženy na μ g proteinu z hlediska rozdílných koncentrací proteinů v jednotlivých biologických vzorcích. Aktivita Nox/Duox poté byla vypočítána jako rozdíl koncentrace H_2O_2 stanoveného specifickou a nespecifickou (bez HRP) oxidací próby na μ g proteinu za jednotku času (30 min).

Data byla zpracována v programu MS Excel a statistika vyhodnocena v programu Statistica.

Tab. 1: Srovnání excitačních a emisních vlnových délek, aktivity HRP, koncentrace prób a použití stop pufru v reakci HRP s jednotlivými fluorescenčními próbami – AR, HVA a skopoletinem.

Próba (ex.-em.)	Finální aktivita HRP ($U \cdot ml^{-1}$)	Finální koncentrace próby (μM)	Stop pufr (μl)
AR (560-587 nm)	10	50	-
HVA (312-420 nm)	10	100	-
Skopoletin (360-460 nm)	10	2	20 μ l

3.2.6 Histochemická detekce HClO metodou s R19S

Syntézu a purifikaci próby R19S, která je specifická pro HClO, provedl doc. RNDr. Miroslav Soural, Ph.D. z Katedry organické chemie podle protokolu publikovaného Chen *et al.* (2016).

Zalévací protizhášecí médium pro mikroskopii bylo připraveno předem na Katedře biotechnologií rozpuštěním 100 mg parafenylendiaminu v 100 μ l DMSO. Poté bylo přidáno 10 ml 1M Tris pufru (pH 8,8) a po promíchání bylo přidáno 90 ml 100% glycerolu. Zalévací médium bylo skladováno ve tmě při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.6.1 Ověření fluorescenčních vlastností R19S

Absence fluorescence R19S a naopak fluorescence R19 byla ověřena v přítomnosti NaClO z produktu SAVO. Zásobní 1mM roztok R19S byl nejdříve 100x zředěn ve vodě, K-fosfátovém a PBS pufru. Do 3 jamek 96jamkové černé mikrodestičky bylo poté napipetováno 50 μ l 10 μ M R19S a 50 μ l 25mM NaClO (zředěno ve stejném roztoku jako R19S). Fluorescence byla měřena při excitační vlnové délce 515 nm a emisi 545 nm na spektrofotometru Synergy HT. Citlivost měření byla nastavena na 75. Kvůli možnosti nastavení emisního spektra při následných mikroskopických pozorováních bylo stanoveno také celé excitační spektrum R19.

3.2.6.2 Příprava vzorků pro histochemickou detekci HClO

Byly použity včely vylíhnuté v laboratoři o stáří cca 1-2 d, aby se co nejvíc zamezilo přítomnosti pylu v trávicí soustavě. Próba R19S byla vyzkoušena 2 různými způsoby – inkubací žaludků a střev v roztoku R19S *in vitro* a krmením včel 50% sacharosou s R19S.

V případě inkubace částí trávicích soustav včel s R19S byly čerstvě vypreparované trávicí soustavy zbaveny výkalového váčku. Vždy 3 žaludky se střevem byly poté přeneseny do 1 ml PBS pufru. Pufr bez R19S sloužil jako negativní kontrola. Do dalších mikroskopavek byla dále přidána R19S o finální koncentraci 20 μ M a látky ovlivňující aktivitu Duox – induktor uracil a inhibitor DPI (o finálních koncentracích 1 mM a 0,1 mM). Dále byl přidán imunitní elicitor LPS o finální koncentraci 30 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a induktor oxidativního stresu PQ o finální koncentraci 25 μ M. Vzorky inkubované pouze s R19S sloužily jako tzv. „mock“ (mokrý) kontrola. Tato inkubace probíhala 1 h za laboratorní teploty. Poté byly žaludky a střeva přeneseny do fixačního roztoku na 50 min a poté dvakrát promyty v PBS pufru po dobu 5 min. Všechny inkubace probíhaly ve tmě, aby se zamezilo vysvícení fluoroforu.

V případě krmení byly včely přeneseny do klícky obsahující stříkačku s 50% sacharosou s 20 μ M R19S. Takto byly včely krmeny cca 24 h, aby byla zajištěna přítomnost R19S v trávicí soustavě. Poté byla část včel ručně krmena z pipety 5 μ l 50% sacharosy s R19S a 1mM uracilem pro indukci aktivity Duox a ponechána 1 h před odběrem trávicích soustav. Následně byly žaludky a střeva přeneseny do fixačního roztoku na 50 minut při laboratorní teplotě a dvakrát promyty v PBS pufru po dobu 5 min (vše opět ve tmě).

3.2.6.3 Mikroskopická pozorování

Promyté vzorky žaludků a střev byly přeneseny do zalévacího protizhášecího média na podložní sklíčko, které bylo na krajích polepené dvěma vrstvami oboustranné lepicí pásky nebo parafilmu, aby po přiložení krycího sklíčka vznikla „komůrka“.

Při samotném mikroskopickém pozorování byla snímána jak oblast viditelného světla, tak i fluorescence vzorku. Zvětšení objektivu bylo 5x nebo 10x z důvodu velikosti vzorků. Na epifluorescenčním mikroskopu byla nastavena excitace při 475 nm, protože byl nejbližší excitačnímu maximu R19 (515 nm). Byla použita barevná kamera, takže fluorescenční kanál ukazoval „reálný“ obraz. Při pozorování na konfokálním mikroskopu (CLSM) byla nastavena excitace při 488 nm a filtr pro emisi na 520-580 nm, z důvodu černobílé kamery byla veškeré fluorescenci přiřazena zelená barva. Při pozorování všech vzorků bylo zachováno stejné nastavení mikroskopu. V softwaru Zeiss ZEN byly při následující úpravě snímků nastaveny u všech obrázků stejné parametry kontrastu (poměr zobrazené černé a bílé barvy).

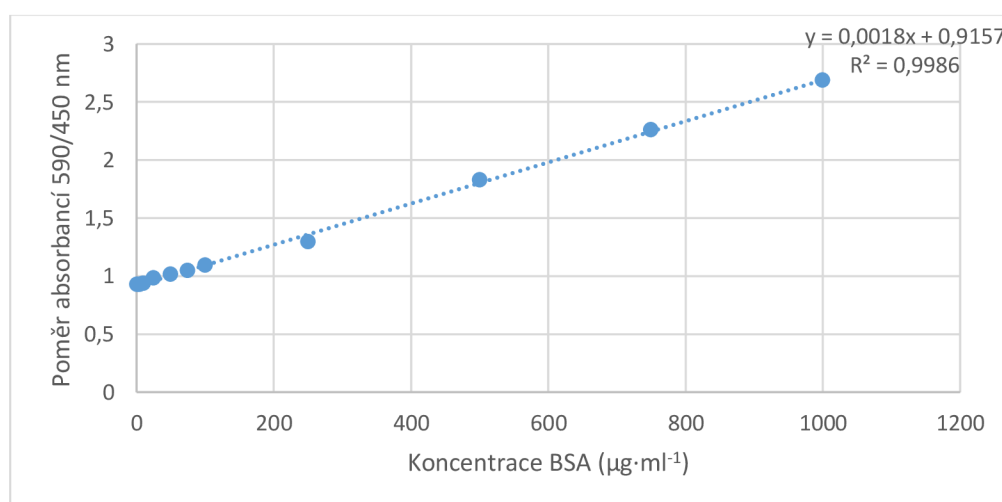
4 Výsledky

Experimentální část práce se zabývala srovnáním 3 fluorescenčních prób běžně používaných pro stanovení koncentrace H_2O_2 v biologických vzorcích – AR, HVA a skopoletinu. Dále byly optimalizovány metody využívající jednotlivé próby. Jednotlivé metody byly vyzkoušeny při měření aktivity Nox/Duox v homogenátech trávicích soustav včel medonosných při použití látek ovlivňujících aktivitu Nox/Duox (NADPH, DPI) nebo koncentraci ROS (SOD). Produkce H_2O_2 v těchto vzorcích byla srovnána s hladinou H_2O_2 naměřenou v přímo v homogenátech trávicích soustav bez inkubace. Dále byla vybrána nejvhodnější próba (AR), kterou byla změřena koncentrace H_2O_2 a aktivita Nox/Duox ve vzorcích včel ovlivněných LPS a PQ. Byla také zavedena histochemická próba R19S specifická na HClO (produkt Duox v trávicí soustavě hmyzu). Mikroskopicky byla srovnána fluorescence ve střevech včel inkubovaných s R19S *in vitro* a včel krmených sacharosou s R19S. K inkubaci byly také přidány látky ovlivňující Duox, imunitní nebo oxidativní reakce – uracil, LPS, PQ a DPI. Připravené vzorky byly pozorovány CLSM a epifluorescenčním mikroskopem.

4.1 Sledování vlivu testovaných látek na celkovou koncentraci proteinů

4.1.1 Určení kalibrační přímky pro stanovení proteinů Bradfordovou metodou

Z naměřených hodnot závislosti poměru absorbancí při 590/450 nm na koncentraci jednotlivých standardů BSA byla vypočtena lineární regresí kalibrační přímka (Obr. 11). Do grafu je zanesen vždy jeden technický triplikát (průměr hodnot stejného standardu ve 3 jamkách).



Obr. 11: Kalibrační přímka stanovení koncentrace proteinů Bradfordovou metodou.

4.1.2 Stanovení koncentrace proteinů biologických vzorků

V nezředěných biologických vzorcích byly naměřené hodnoty absorbancí vyšší než hodnoty v kalibrační křivce. Biologické vzorky byly proto před měřením zředěny ddH₂O, nejvhodnější faktor ředění byl 10. Naměřené hodnoty biologických vzorků byly nejprve zprůměrovány – průměr triplikátu byl brán jako jedno technické opakování. Následně byly zprůměrovány i jednotlivá technická opakování a ze získaných hodnot byla následně vypočtena koncentrace proteinů. Výsledky pak byly vynásobeny faktorem ředění na reálné hodnoty (Tab. 2). Nejvyšší koncentrace byly naměřeny v homogenátu z žaludků a střev a membránové frakci z žaludků a střev. Hlavní důvod je absence výkalového váčku, který v sobě má většinu obsahu trávicí soustavy. U dalších vzorků, kde byl výkalový váček zachován, byly naměřeny nižší koncentrace proteinů právě z důvodu naředění izolovaných proteinů obsahem trávicí soustavy. Z Tab. 2 vyplývá, že koncentrace naměřených proteinů se po delším vystavení PQ snižovala (včetně kontroly, včely tedy např. kvůli stresu z manipulace mohly přestat přijímat potravu). Naměřená koncentrace proteinů u včel vystavených LPS po dobu 48 h byla naopak vyšší než u skupiny vystavených LPS po dobu 24 h. Různé koncentrace LPS nevykazují vliv na skupiny různě starých včel. Nejvyšší rozdíl byl pozorován u skupiny 1-2d včel po vystavení LPS po dobu 24 h. U kontrolní skupiny byla naměřena mnohem nižší koncentrace proteinů.

Tab. 2: Vypočtená koncentrace proteinů v jednotlivých biologických vzorcích s uvedenými směrodatnými odchylkami a počtem technických opakování (n).

Biologický vzorek	Koncentrace proteinů ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)
Homogenát z žaludků a střev	4202 \pm 439 (n=9)
Membránová frakce z žaludků a střev	5246 \pm 267 (n=6)
Včely vystavené PQ	(n=8-9)
2 h kontrola	1551 \pm 358
2 h 25mM	1690 \pm 158
2 h 50mM	1635 \pm 348
4 h kontrola	2432 \pm 296
4 h 25mM	1274 \pm 98
4 h 50mM	1202 \pm 136
8 h kontrola	940 \pm 83
8 h 25mM	1064 \pm 124
8 h 50mM	1209 \pm 266

Tab. 2: Vypočtená koncentrace proteinů v jednotlivých biologických vzorcích s uvedenými směrodatnými odchylkami a počtem technických opakování (n). (pokračování)

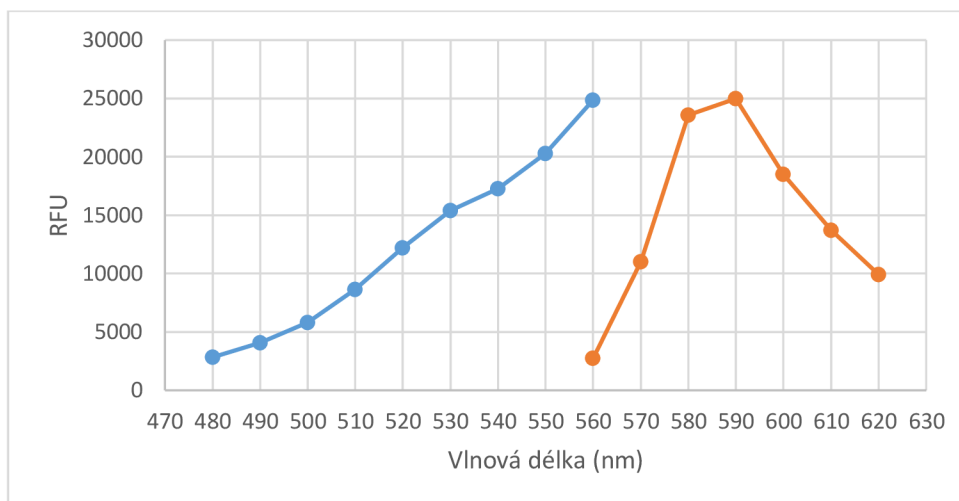
Biologický vzorek	Koncentrace proteinů ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)
Včely vystavené LPS po dobu 24 h (n=8-9)	
1-2 d staré včely kontrola	1057 ± 161
1-2 d staré včely 15 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	1843 ± 149
1-2 d staré včely 30 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	2908 ± 391
1-2 d staré včely 60 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	2888 ± 264
2-3 d staré včely kontrola	1668 ± 176
2-3 d staré včely 15 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	1375 ± 159
2-3 d staré včely 30 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	1405 ± 147
2-3 d staré včely 60 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	1406 ± 127
4-5 d staré včely kontrola	1482 ± 114
4-5 d staré včely 30 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	1475 ± 186
Včely vystavené LPS po dobu 48 h (n=8-9)	
1-2 d staré včely kontrola	2375 ± 456
1-2 d staré včely 15 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	2250 ± 402
1-2 d staré včely 30 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	2866 ± 392
1-2 d staré včely 60 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	3185 ± 384
2-3 d staré včely kontrola	2022 ± 282
2-3 d staré včely 15 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	1778 ± 267
2-3 d staré včely 30 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	1886 ± 278
2-3 d staré včely 60 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	1914 ± 322
4-5 d staré včely kontrola	1685 ± 243
4-5 d staré včely 30 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	2164 ± 138 (n=4)

4.2 Stanovení obsahu H_2O_2 fluorimetrickou metodou s AR

Citlivost fotonásobiče destičkového fluorimetru byla nastavena automaticky podle hodnoty fluorescence nejvyššího standardu H_2O_2 (10 μM). Program GEN5 vyhodnotil nejlepší citlivost na $S = 81$. Tato hodnota byla používána u všech dalších měření metodou s AR. V případě, že biologické vzorky vykazovaly fluorescenci vyšší než detekční limit fluorimetru, byly vzorky před příštím opakování více zředěny. V práci je občas uvedena zkratka RFU, jedná se o relativní fluorescenční jednotku – fluorescenci danou nastavením fluorimetru a fluoroforem v konkrétním vzorku (ve stejném vzorku by měla být v ideálním případě vždy stejná).

4.2.1 Určení excitačního a emisního spektra resorufinu

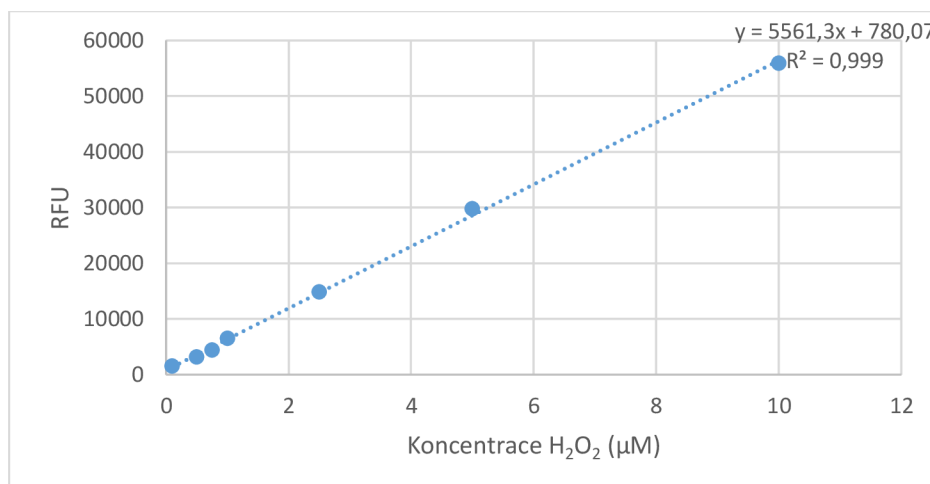
Excitační maximum resorufinu se uvádí při 563 nm. Většina protokolů využívajících metodu s AR k stanovení koncentrace H_2O_2 využívá excitační vlnovou délku při 530 nm, pravděpodobně z důvodu omezení překryvu fluorescence. Excitační a emisní spektrum fluorescence resorufinu tak bylo změřeno na fluorimetru (Obr. 12).



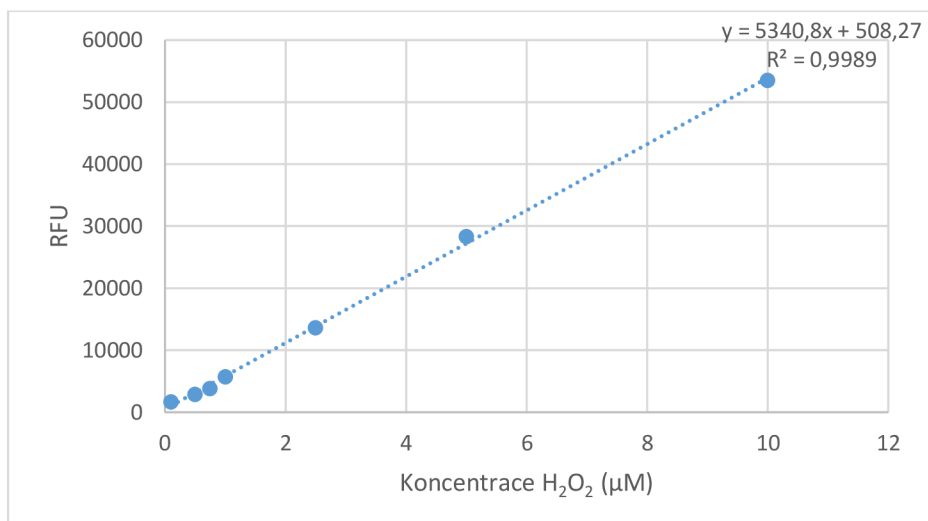
Obr. 12: Excitační (modře) a emisní (oranžově) spektrum resorufinu získané reakcí $1\mu\text{M}$ standardu H_2O_2 s reakční směsí HRP o aktivitě $10\text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$ a $50\mu\text{M}$ AR. Hodnoty reprezentují 1 technický triplikát.

4.2.2 Určení kalibrační přímky

Z hodnot závislosti fluorescence na koncentraci jednotlivých standardů H_2O_2 při excitaci a emisi 560/587 nm byly vypočteny lineární regresí kalibrační přímky (Obr. 13 a 14). Kalibrační přímky byly připraveny pro 2 rozdílné aktivity HRP – 20 a $0,4\text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$. Kalibrační přímka s vyšší aktivitou HRP byla použita při srovnání prób a stanovení aktivity Nox/Duox v kontrolním vzorku (Obr. 13). Kalibrační přímka s nižší aktivitou HRP byla použita při stanovení koncentrace H_2O_2 ve vzorcích ovlivněných LPS a PQ (Obr. 14). Z Obr. 13 a 14 je patrné, že rozdíl v aktivitě HRP nemá při použití standardů na naměřenou fluorescenci vliv (naměřené hodnoty jsou téměř identické).



Obr. 13: Kalibrační přímka stanovení koncentrace H_2O_2 metodou s AR při vyšší aktivitě HRP ($20\text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$). Hodnoty reprezentují 1 technický triplikát.



Obr. 14: Kalibrační přímka stanovení koncentrace H₂O₂ metodou s AR při nižší aktivitě HRP (0,4 U·ml⁻¹). Hodnoty reprezentují 1 technický triplikát.

4.2.3 Stanovení aktivity Nox/Duox

Aktivita Nox/Duox bývá běžně stanovena jako rozdíl v koncentraci ROS (nejčastěji H₂O₂) přítomných ve vzorku bez a za přítomnosti NADPH vytvořených za jednotku času. Obvykle se také počítá rozdíl mezi nescifickou (bez přítomnosti HRP) a specifickou (za přítomnosti HRP) oxidací fluorescenční próby. V této práci srovnávám naměřené koncentrace H₂O₂ ještě za dalších parametrů – bez inkubace, po přidavku SOD, inhibitoru DPI nebo před a po denaturaci (Tab. 3).

Tab. 3: Srovnání naměřených koncentrací H₂O₂ vztahených na μg proteinů v homogenátu z žaludků a střev při jednotlivých parametrech reakce a rozdíl mezi specifickou a nescifickou oxidací AR.

Parametr	Nescifická oxidace (μmol H ₂ O ₂ ·μg ⁻¹ proteinů)	Specifická oxidace (μmol H ₂ O ₂ ·μg ⁻¹ proteinů)	Rozdíl
Bez inkubace	1,48	4,90 (n=10)	3,42 ± 0,26
Bez inkubace se SOD	1,19	1,59 (n=10)	0,40 ± 0,13
Inkubace bez NADPH	0,75	1,59 (n=10)	0,84 ± 0,08
Inkubace s NADPH	0,75	2,59 (n=10)	1,84 ± 0,12
Inkubace bez NADPH se SOD	0,34	0,44 (n=5)	0,10 ± 0,03
Inkubace s NADPH se SOD	0,39	0,70 (n=5)	0,31 ± 0,02
Inkubace s NADPH po denaturaci	0,03	2,82 (n=5)	2,79 ± 0,04
Inkubace s NADPH před denaturaci	0,03	1,00 (n=5)	0,97 ± 0,05
Inkubace s NADPH a DPI	0,02	0,14 (n=5)	0,12 ± 0,01
Inkubace s NADPH a DPI po denaturaci	0,04	2,89 (n=6)	2,85 ± 0,10

Z Tab. 3 vyplývá, že nejvyšší naměřená koncentrace H_2O_2 byla ve vzorku bez inkubace bez přidání SOD ($3,42 \pm 0,26 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \cdot \text{mg}^{-1}$ proteinů). Nejblíže se této hodnotě blížily vzorky inkubované s biologickým vzorkem po denaturaci. To by mohlo znamenat, že kromě tvorby ROS enzymy Nox/Duox, jsou během inkubace aktivní také antioxidační systémy. Vystavení reakční směsi po inkubaci teplotě 95°C po dobu 10 min (čímž by mělo dojít k denaturaci proteinů) také vedla ke snížení nespecifické oxidace AR – tato próba je tedy oxidovatelná také jinými enzymy než HRP, a právě denaturace před reakcí s HRP tomu brání. Rozdíl mezi naměřenými hodnotami H_2O_2 u vzorků inkubovaných s a bez NADPH byl cca $1 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \cdot \text{mg}^{-1}$ proteinů. Byl také potvrzen inhibiční efekt DPI, kdy naměřená koncentrace H_2O_2 byla asi 14x nižší než při inkubaci s NADPH bez inhibitoru. Zajímavé také je, že inkubace s DPI vedla k téměř nulové nespecifické oxidaci. DPI je nespecifický inhibitor flavoenzymů – je tedy možné, že právě tyto enzymy oxidují AR. Inkubace se SOD vedla překvapivě k nižším naměřeným hodnotám H_2O_2 jak ve skupině nespecifické, tak i specifické oxidace. Jeden z možných důvodů je zvýšení rychlosti přeměny vytvořeného O_2^\cdot na H_2O_2 , který tak mohl být v homogenátu rychleji odbourán CAT.

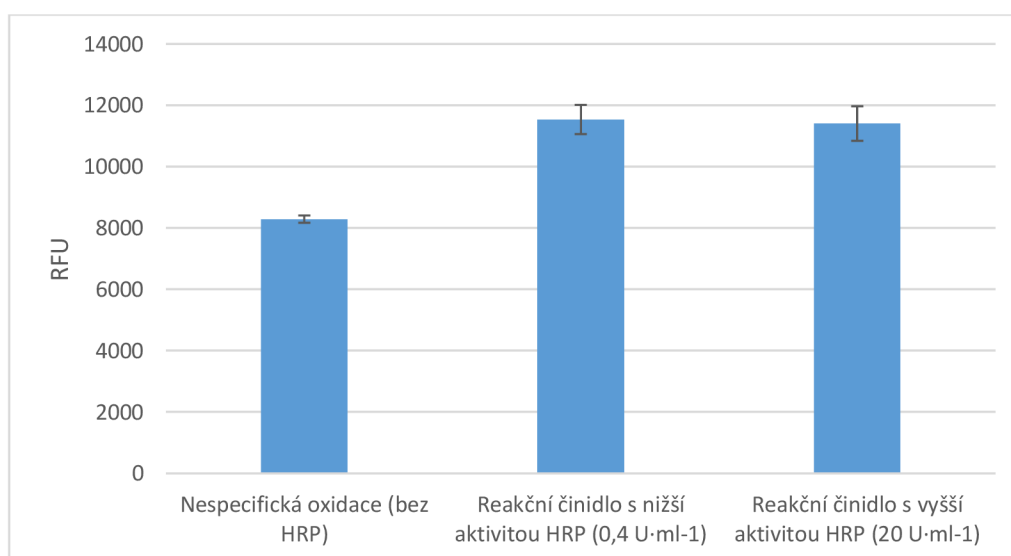
Dále byla koncentrace H_2O_2 měřena v membránové frakci získané ultracentrifugací (Tab. 4). Frakce by měla obsahovat Nox/Duox a menší množství proteinů, které by mohly interferovat s tvořenými ROS nebo enzymy použitými v reakcích. Naměřené hodnoty H_2O_2 na μg proteinů však byly nižší než v homogenátu. To by potvrdzovalo, že část (v případě homogenátu většina) naměřeného H_2O_2 je přítomná už ve vzorku a během inkubace ho rozkládají antioxidační enzymy (viz Tab. 4 – Inkubace bez NADPH). Ani po inkubaci s NADPH však nebyla naměřená vyšší hodnota než při stejném parametru v homogenátu. Pravděpodobné vysvětlení by mohla být ztráta enzymů Nox/Duox během ultracentrifugace. Stejně jako v homogenátu byly při inkubaci naměřeny nejvyšší hodnoty naměřené ve vzorcích po denaturaci.

Tab. 4: Srovnání naměřených koncentrací H₂O₂ vztažených na µg proteinů v membránové frakci žaludků a střev při jednotlivých parametrech reakce a rozdíl mezi specifickou a nespecifickou oxidací AR.

Parametr	Nespecifická oxidace (µM H ₂ O ₂ ·µg ⁻¹ proteinů)	Specifická oxidace (µM H ₂ O ₂ ·µg ⁻¹ proteinů)	Rozdíl
Inkubace bez NADPH	1,81	1,71 (n=10)	-0,10 ± 0,06
Inkubace s NADPH	1,73	2,31 (n=10)	0,58 ± 0,09
Inkubace s NADPH se SOD	1,17	1,78 (n=10)	0,61 ± 0,08
Inkubace s NADPH po denaturaci	0,06	1,55 (n=2)	1,49 ± 0,02
Inkubace s NADPH a DPI po denaturaci	0,02	1,39 (n=11)	1,37 ± 0,05

4.2.4 Srovnání vlivu aktivity HRP v reakčním činidlu na naměřené hodnoty fluorescence

Pro validaci dalšího využívání reakčního činidla s nižší aktivitou HRP byl proveden experiment kvantifikace fluorescence biologického vzorku bez inkubace (Obr. 15). Jako kontrola sloužil biologický vzorek s AR bez próby, specifická oxidace AR byla měřena HRP o aktivitách 0,4 a 20 U·ml⁻¹. Z Obr. 15 plyne, že je fluorescence vzorku po reakci s HRP o rozdílných aktivitách téměř totožná také v homogenátu.



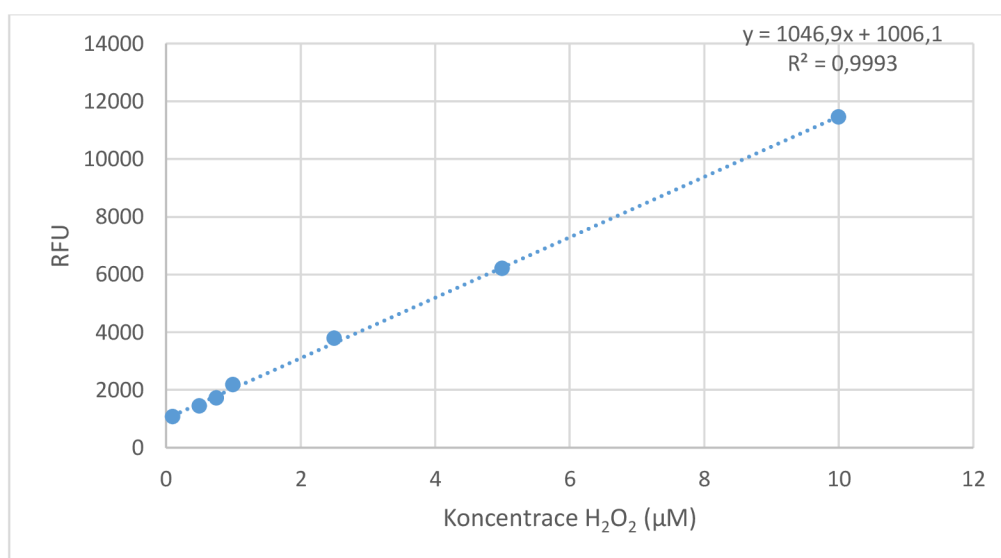
Obr. 15: Srovnání fluorescence biologického vzorku bez použití HRP a s použitím HRP s nižší a vyšší aktivitou (0,4 a 20 U·ml⁻¹). Chybové úsečky reprezentují směrodatnou odchylku jednotlivých měření (n=2, tzn. z 6 jamek).

4.3 Stanovení obsahu H₂O₂ fluorimetrickou metodou s HVA

Analogicky k předešlé metodě s AR byla i u metody s HVA určena citlivost fotonásobiče podle fluorescence standardu s nejvyšší koncentrací H₂O₂. Pro všechna měření s HVA tak byla používána automaticky nastavená citlivost 109.

4.3.1 Určení kalibrační přímky

Analogicky k metodě s AR byla i pro metodu s HVA určena kalibrační přímka. Z hodnot závislosti fluorescence na koncentraci jednotlivých standardů H₂O₂ při excitaci a emisi 312/420 nm byla vypočtena lineární regresí kalibrační přímka (Obr. 16).



Obr. 16: Kalibrační přímka stanovení koncentrace H₂O₂ metodou s HVA. Hodnoty reprezentují 1 technický triplikát.

4.3.2 Stanovení aktivity Nox/Duox

Aktivita byla stanovována jako při předchozí metodě s AR. Na rozdíl od metody s AR byla při využití metody s HVA naměřena vysoká nescifická oxidace (Tab. 5). HVA je tedy méně specifický substrát HRP. Zajímavé je také to, že u metody stanovení koncentrace H₂O₂ s HVA byla pozorována specifická oxidace vzorků bez inkubace nižší než těch po inkubaci. Nejvyšší koncentrace H₂O₂ zjištěné rozdílem nescifické a specifické oxidace vykazovaly opět vzorek po a před denaturací. Vzhledem k vysokým hodnotám nescifické oxidace HVA byla tato metoda vyhodnocena jako nevhodná pro stanovení koncentrace H₂O₂ a aktivity Nox/Duox v homogenátech z tkání.

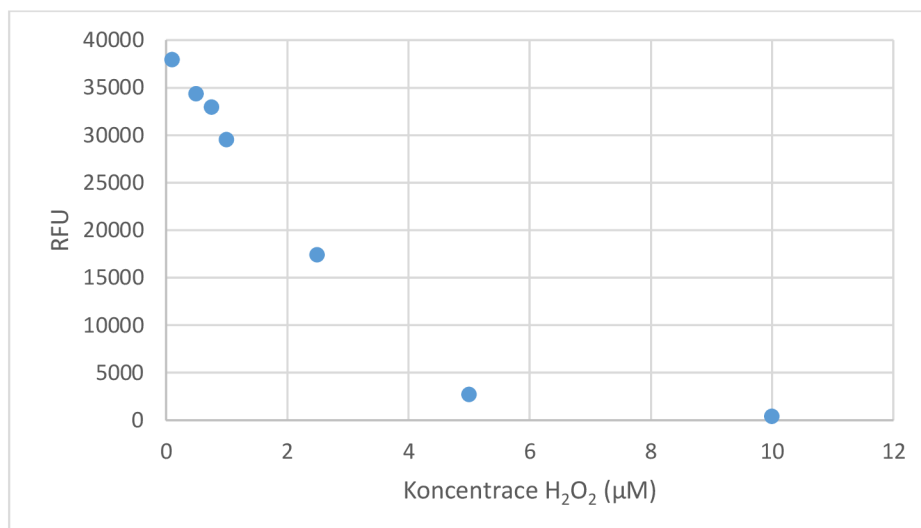
Tab. 5: Srovnání naměřených koncentrací H₂O₂ vztažených na µg proteinů v homogenátu z žaludků a střev při jednotlivých parametrech reakce a rozdíl mezi specifickou a nespecifickou oxidací HVA.

Parametr	Nespecifická oxidace (µM H ₂ O ₂ ·µg ⁻¹ proteinů)	Specifická oxidace (µM H ₂ O ₂ ·µg ⁻¹ proteinů)	Rozdíl
Bez inkubace	0,29	0,29 (n=10)	0
Bez inkubace se SOD	0,27	0,43 (n=10)	0,16 ± 0,02
Inkubace bez NADPH	0,40	0,42 (n=10)	0,02 ± 0,01
Inkubace s NADPH	1,56	1,58 (n=10)	0,02 ± 0,08
Inkubace bez NADPH se SOD	0,40	0,40 (n=5)	0
Inkubace s NADPH se SOD	1,47	1,48 (n=5)	0,01 ± 0,03
Inkubace s NADPH před denaturací	0,80	3,75 (n=5)	2,95 ± 0,07
Inkubace s NADPH a DPI	0,85	0,90 (n=5)	0,05 ± 0,01
Inkubace s NADPH a DPI po denaturaci	3,69	5,39 (n=6)	1,70 ± 0,12

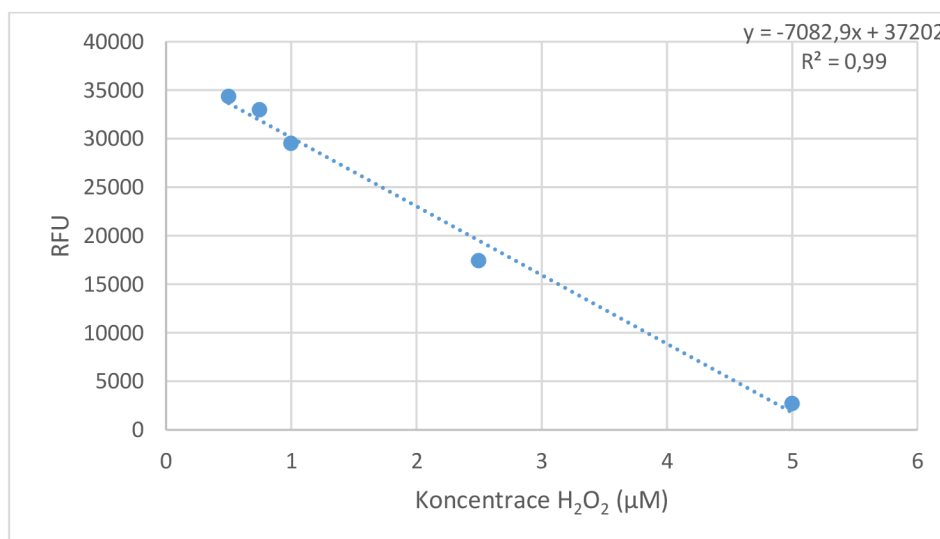
4.4 Stanovení obsahu H₂O₂ fluorimetrickou metodou se skopoletinem

4.4.1 Určení kalibrační přímky

Stejně jako u předchozích metod byla i pro metodu se skopoletinem určena kalibrační přímka. Hodnoty závislosti fluorescence na koncentraci jednotlivých standardů H₂O₂ při excitaci a emisi 360/460 nm byly vyneseny do grafu (Obr. 17). Ten je však hyperbolický a pro linearizaci tedy byl vynechán standard s nejvyšší koncentrací H₂O₂ (10 µM). Standard s nejnižší koncentrací H₂O₂ (0,1 µM) navíc vykazoval vyšší koncentraci než blank, i když by se oxidací skopoletinu za přítomnosti H₂O₂ a HRP měla snížit fluorescence. Kalibrační přímka bez těchto hodnot tedy byla vypočtena lineární regresí (Obr. 18). Z Obr. 17 je jasné, že skopoletin rychle ztrácí fluorescenci, která je při koncentracích H₂O₂ nad 5 µM nulová.



Obr. 17: Standardy v původním rozsahu koncentrací H₂O₂ vykazují při metodě se skopoletinem hyperbolické rozložení. Hodnoty reprezentují 1 technický triplikát.



Obr. 18: Kalibrační přímka stanovení koncentrace H₂O₂ metodou se skopoletinem. Hodnoty reprezentují 1 technický triplikát.

4.4.2 Stanovení aktivity Nox/Duox

Při testování metody se skopoletinem byly všechny hodnoty fluorescence vyšší než hodnoty, ze kterých byla vytvořena kalibrační přímka (Tab. 6). Nebylo tedy možné převést naměřenou fluorescenci na koncentraci H₂O₂. Ve většině případů byla navíc specifická oxidace skopoletinu vyšší než nespecifická, jedinou výjimkou bylo provedení denaturace po inkubaci s NADPH. I tak však byly naměřené hodnoty mimo kalibrační přímku. Metoda tak byla považována za nevhodnou pro tento typ měření a od měření s dalšími parametry bylo upuštěno.

Tab. 6: Srovnání naměřených fluorescencí v homogenátu z žaludků a střev při jednotlivých parametrech reakce a rozdíl mezi specifickou a nespecifickou oxidací skopoletinu.

Parametr	Nespecifická oxidace (RFU)	Specifická oxidace (RFU)
Bez inkubace	45006	48067 (n=10)
Inkubace bez NADPH	46099	53130 (n=10)
Inkubace s NADPH	51065	57104 (n=10)
Inkubace bez NADPH se SOD	53367	58695 (n=5)
Inkubace s NADPH se SOD	56774	58032 (n=5)
Inkubace s NADPH před denaturací	51097	38466 (n=5)
Inkubace s NADPH a DPI	52945	56236 (n=5)

4.5 Stanovení koncentrace H₂O₂ ve včelách ovlivněných LPS a PQ

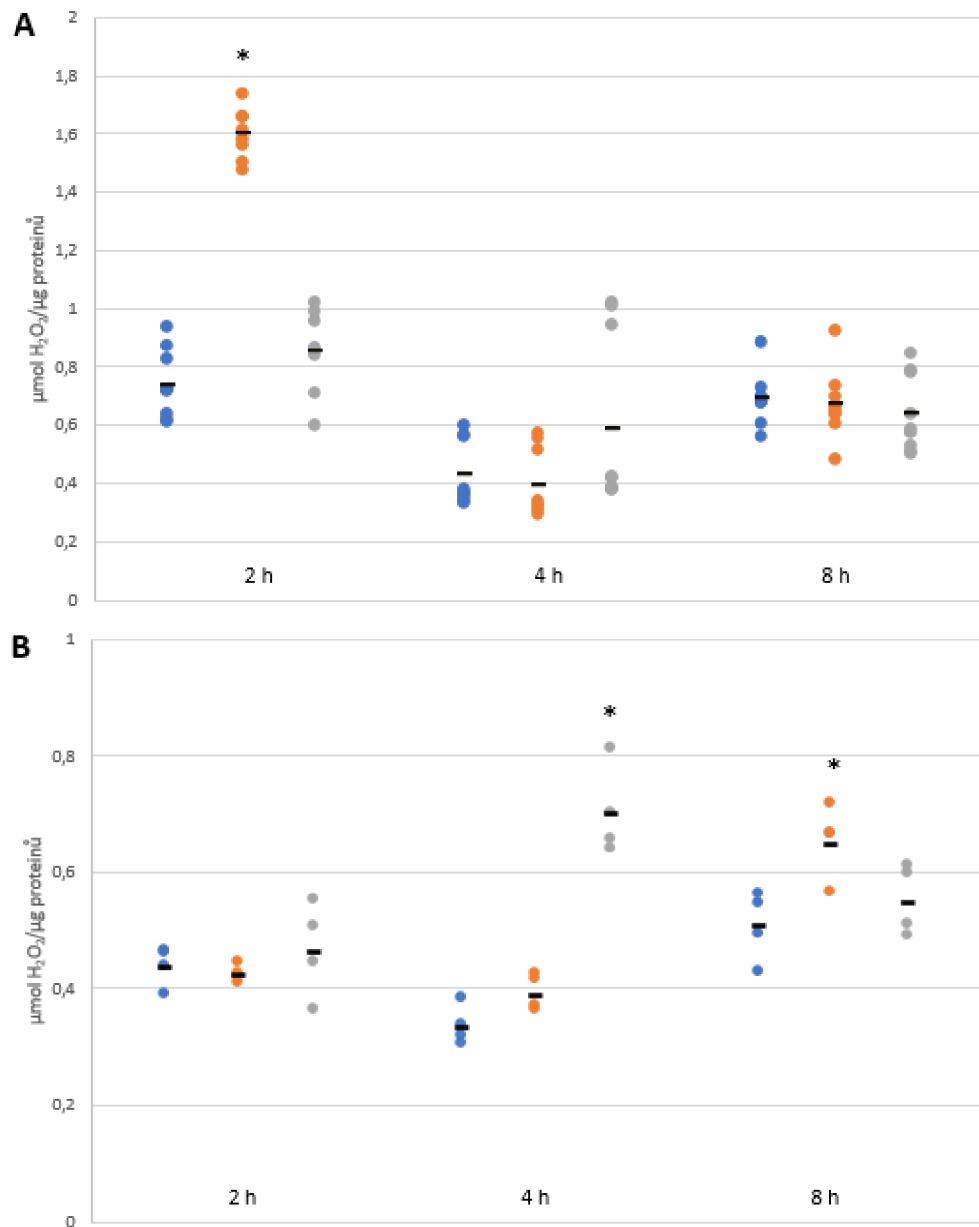
K srovnávání koncentrací H₂O₂ v trávicích soustavách včel ovlivněných LPS a PQ byla použita pouze metoda s AR, která byla vyhodnocena jako nejlepší pro měření v homogenátu z tkání. Ve všech skupinách byla změřena koncentrace H₂O₂ v homogenátech bez inkubace s NADPH a po inkubaci s NADPH – měření „aktivity“ Nox/Duox (Obr. 19-21). Jako výsledná koncentrace H₂O₂ byl použit rozdíl nespecifické a specifické oxidace AR, který byl dále vztažen na μg proteinů ve vzorku. Jako statistický test byla použita ANOVA s Bonferroniho korekcí. ANOVA byla použita ke srovnání vlivu koncentrace testované látky na naměřené hodnoty vůči kontrole. Bonferroniho procedura se používá ke korekci falešně pozitivních výsledků, byla zvolena vzhledem k počtu technických opakování do 10.

Po expozici včel PQ došlo ve při měření bez inkubace s NADPH k signifikantnímu zvýšení koncentrace H₂O₂ pouze po 2 h od expozice u skupiny, které byl podáván 25mM PQ (cca 2x vyšší než kontrola) (Obr. 19A). Vyšší koncentrace PQ nevedla ke zvýšení hladiny H₂O₂. Po 4 a 8 h od začátku expozice včel PQ nedošlo k signifikantní změně koncentrace H₂O₂. Po 4 h však u všech vzorků klesla hladina H₂O₂ na polovinu. Měření aktivity Nox/Duox, která byla zjišťovaná inkubací vzorků s NADPH, naopak ukázalo, že po 4 h došlo ke změně aktivity Nox/Duox u vzorků ovlivněných 50mM PQ (Obr. 19B). Zvýšení aktivity bylo pozorováno i po 8 h, konkrétně u skupiny vystavené 25mM PQ (Obr. 19B).

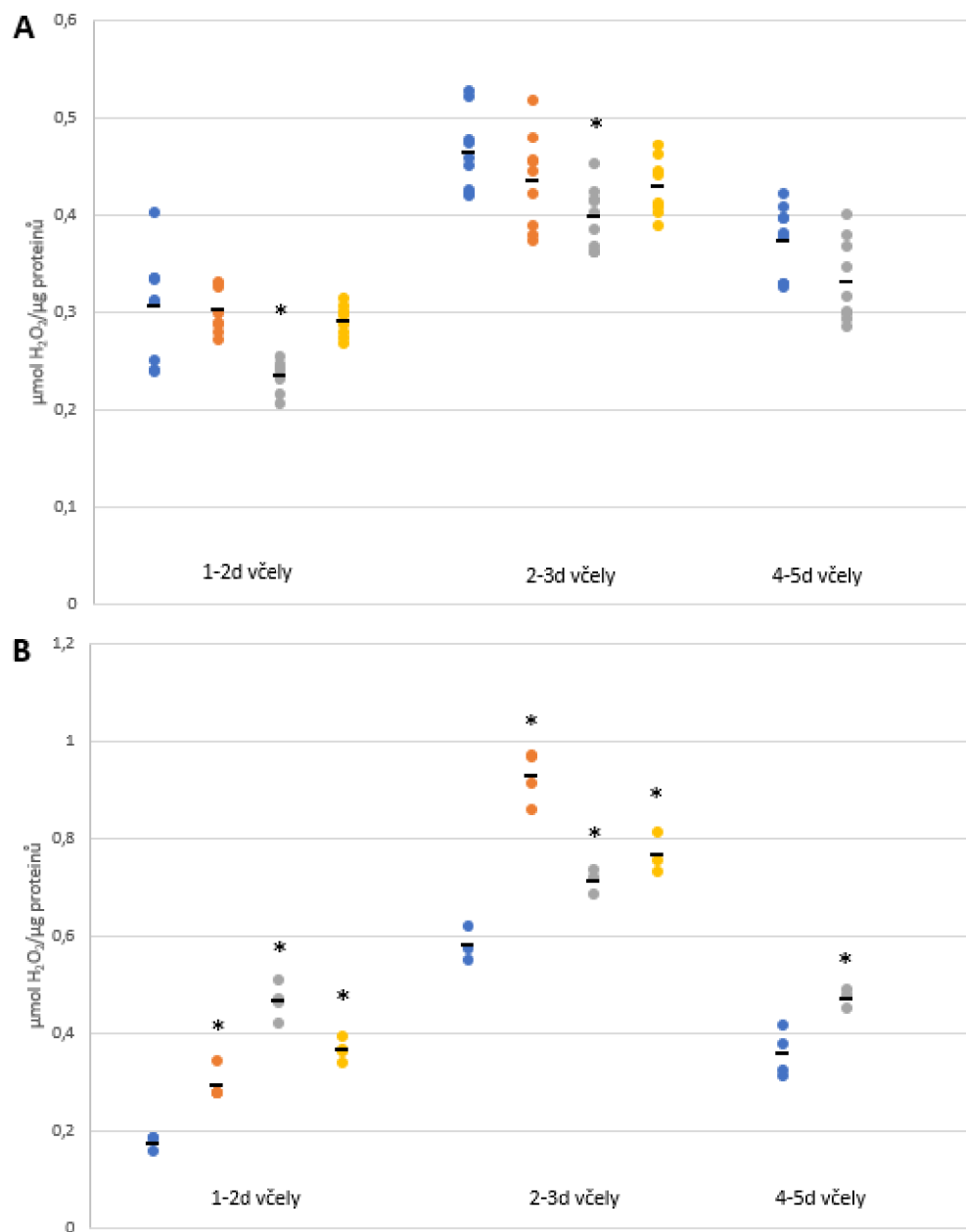
Při stanovení hladiny H₂O₂ ve vzorcích včel vystavených LPS po dobu 24 h došlo u nejmladších včel (1-2 d) k signifikantnímu snížení koncentrace H₂O₂ u skupiny inokulované LPS o koncentraci 30 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Obr. 20A). U včel starých 2-3 d byla obecně hladina H₂O₂ cca 1,5x vyšší než u včel starých 1-2 d. Významně byla opět snížena u skupiny vystavené LPS o koncentraci 30 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Obr. 20A). Hladina H₂O₂ naměřená

u včel starých 4-5 d se pohybovala mezi koncentrací naměřenou u 1-2d a 2-3d včel a po vystavení LPS nebyla významně změněna (Obr. 20A). Naopak měření aktivity Nox/Duox vedlo k signifikantně zvýšeným koncentracím H_2O_2 oproti kontrolám u všech různě starých skupin včel i koncentrací LPS (Obr. 20B). Naměřené koncentrace H_2O_2 u kontrol byly zhruba stejné jako u vzorků neinkubovaných s NADPH, ale hladiny H_2O_2 ve vzorcích inkubovaných s NADPH byly zvýšené oproti koncentracím ve vzorcích bez inkubace.

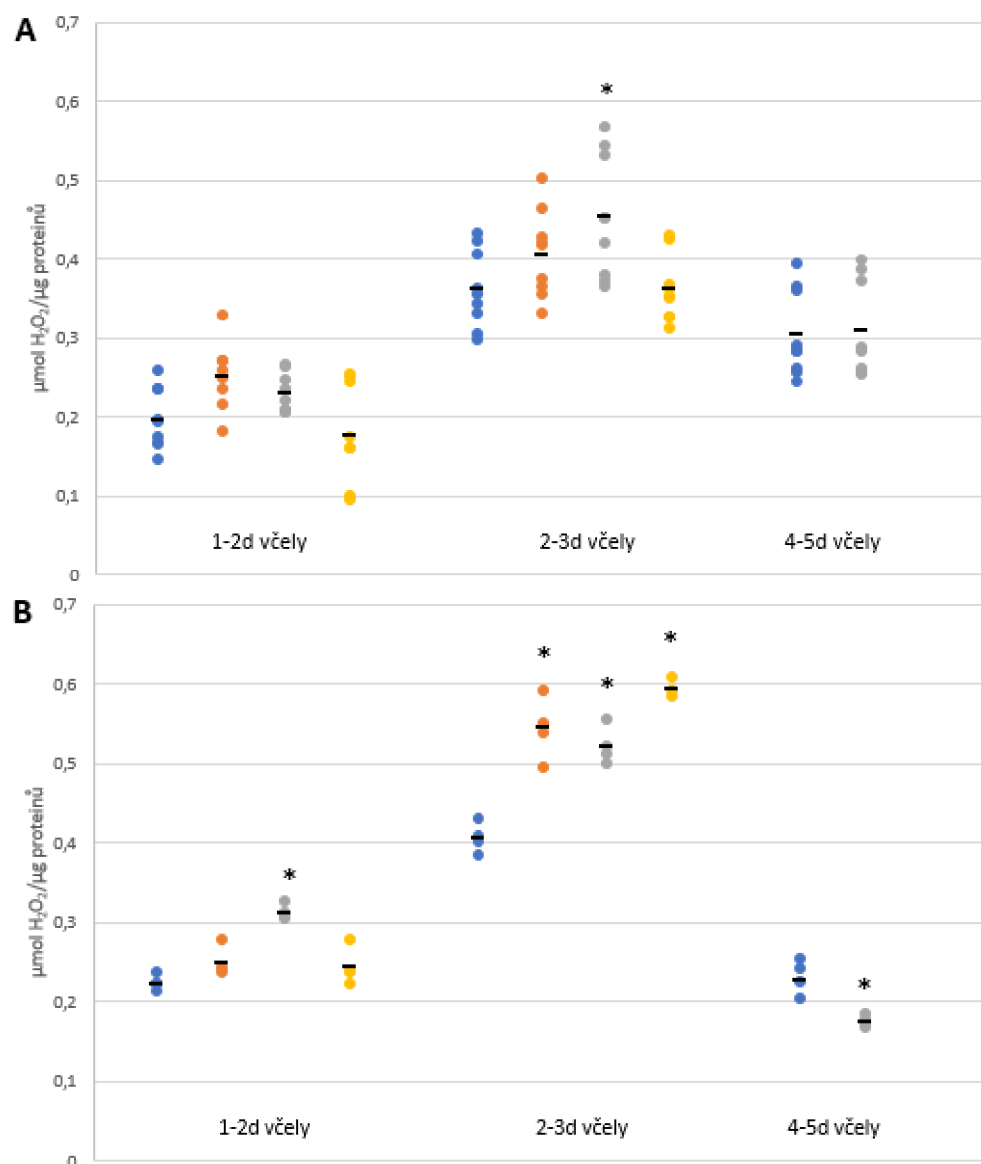
Podobný trend u neinkubovaných vzorků včel vystavených LPS byl pozorován i po 48 h od začátku experimentu (Obr. 21A). U 2-3d včel byla naměřená hladina H_2O_2 cca 1,5x zvýšena oproti včelám starým 1-2 d. Koncentrace H_2O_2 včel starých 4-5 d byla opět někde uprostřed předchozích dvou skupin. Jediný signifikantní rozdíl bylo zvýšení hladiny H_2O_2 u 2-3d včel vystavených LPS o koncentraci $30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Obr. 21A). Stanovení hladiny H_2O_2 u vzorků včel inkubovaných s NADPH ukázalo signifikantní zvýšení ve skupině 1-2d starých včel opět u skupiny vystavené $30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ LPS (Obr. 21B). Aktivita Nox/Duox včel starých 2-3 d po 48h vystavení LPS vedla k signifikantnímu zvýšení hladiny H_2O_2 při všech koncentracích tohoto imunitního elicitoru. Naměřené koncentrace H_2O_2 byly cca 1,5x vyšší než u vzorků stejné skupiny neinkubovaných s NADPH (Obr. 21). Naopak aktivita Nox/Duox včel starých 4-5 d nebyla u včel vystavených LPS nijak zvýšená.



Obr. 19: Vliv podání PQ po dobu 2, 4 a 8 h na naměřené koncentrace H_2O_2 na μg proteinů ve vzorcích trávicích soustav 1-2d včel. **A** – bez inkubace s NADPH (n=8-9); **B** – po 30min inkubaci s 0,2mM NADPH (n=3-4). Vysvětlení symbolů: • - kontrola; • - 25mM PQ; • - 50mM PQ; černé úsečky reprezentují průměrné hodnoty. Statistická významnost byla vždy stanovena vůči kontrole daného časového úseku a v případě $p < 0,05$ byla označena *.



Obr. 20: Vliv podání LPS po dobu 24 h na naměřené koncentrace H_2O_2 na μg proteinů ve vzorcích včel starých 1-2, 2-3 a 4-5 d. **A** – bez inkubace s NADPH (n=8-9); **B** – po 30min inkubaci s 0,2 mM NADPH (n=3-4). Vysvětlení symbolů: • - kontrola; • - 15 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ LPS; • - 30 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ LPS; • - 60 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ LPS; černé úsečky reprezentují průměrné hodnoty. Statistická významnost byla vždy stanovena vůči kontrole daného časového úseku a v případě $p < 0,05$ byla označena *.



Obr. 21: Vliv podání LPS po dobu 48 h na naměřené koncentrace H₂O₂ na µg proteinů ve vzorcích včel starých 1-2, 2-3 a 4-5 d. **A** – bez inkubace s NADPH (n=8-9); **B** – po 30min inkubaci s 0,2mM NADPH (n=3-4). Vysvětlení symbolů: • - kontrola; • - 15 µg·ml⁻¹ LPS; • - 30 µg·ml⁻¹ LPS; • - 60 µg·ml⁻¹ LPS; černé úsečky reprezentují průměrné hodnoty. Statistická významnost byla vždy stanovena vůči kontrole daného časového úseku a v případě p < 0,05 byla označena *.

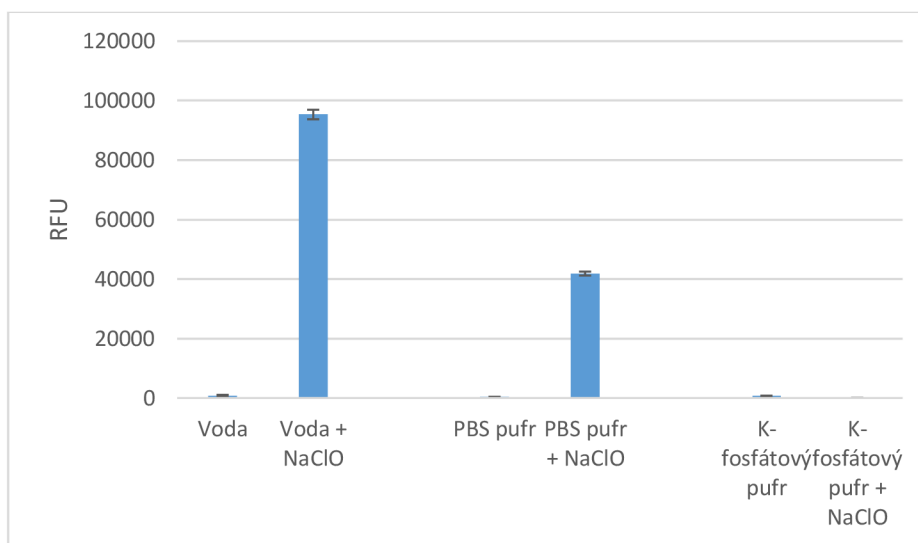
4.6 Histochemická analýza aktivity Duox s detekcí HClO

4.6.1 Testování fluorescenční sondy R19S

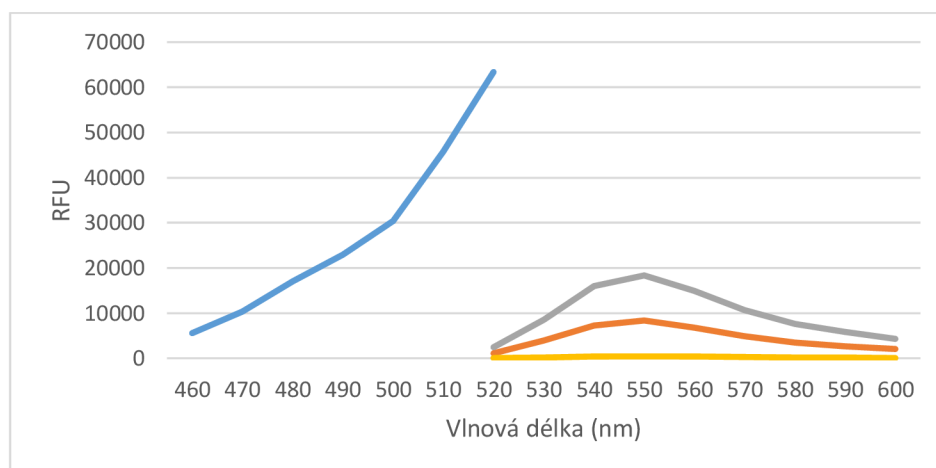
Prvním krokem před mikroskopickým pozorováním bylo ověření fluorescence R19, což je produkt reakce R19S s ClO⁻. Z Obr. 22 je zřejmé, že bez přítomnosti ClO⁻ nedošlo k fluorescenci, protože nevznikalo R19. R19S tak samo o sobě žádnou fluorescenci nevykazuje. Nejvyšší fluorescenci vykazoval zásobní roztok R19S zředěný ve vodě, zhruba poloviční v pak v PBS pufru a žádnou v K-fosfátovém pufru. Pro inkubaci vzorků

střev s R19S byl tedy zvolen PBS pufr (kvůli lepšímu zachování fyziologického prostředí).

Vzhledem k absenci excitačního laseru v oblasti kolem 515 nm, která je v literatuře uváděná jako excitační maximum R19, byla testována emisní spektra R19 při excitaci vlnovými délkami dostupných laserů (475 a 488 nm) (Obr. 23). Bylo potvrzeno excitační maximum při 515 nm a emisní maximum při cca 550 nm, které je u excitací při 475 a 488 nm výrazně nižší než při 515 nm (Obr. 22 a 23).



Obr. 22: Fluorescence 10 μ M R19S ve vodě, PBS a K-fosfátovém pufru bez a s přidáním 25mM NaClO. Excitační a emisní vlnové délky byly 515 a 545 nm. Chybové úsečky reprezentují směrodatnou odchylku v technickém triplicátu.



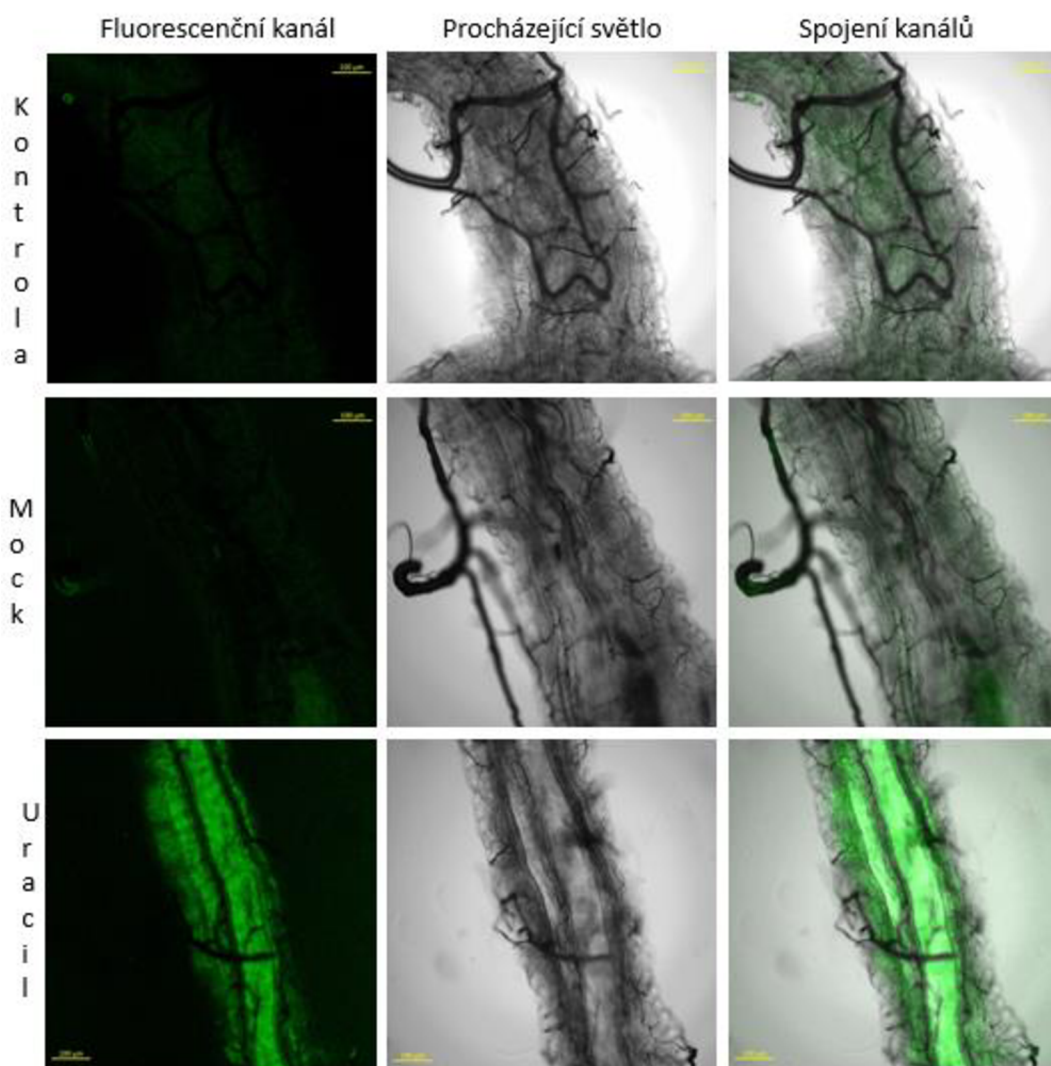
Obr. 23: Excitační a emisní spektra R19 (10 μ M R19S ve vodě po přidání 25mM NaClO). Excitační spektrum je znázorněno modře, šedě emisní spektrum při excitaci 488 nm, oranžově emisní spektrum při excitaci 475 nm a žlutě emisní spektrum R19S bez NaClO při excitaci 488 nm.

4.6.2 Mikroskopická pozorování s využitím R19S

Mikroskopická pozorování fluorescence ve střevech včel byla provedena na dvou skupinách – včelách krmených R19S a střev inkubovaných s R19S *in vitro*. V případě krmení bylo včelám po dobu 24 h podáváno 20 μ M R19S v 50% sacharose (mock kontrola) a 1 h před odebráním střev také s přidavkem 1mM uracilu (induktor aktivity Duox). Druhou skupinu tvořila odebraná střev byla 1 h inkubována v PBS pufru obsahujícím 20 μ M R19S a další látky (1mM uracil, 30 μ g·ml⁻¹ LPS, 25 μ M PQ a 0,1mM DPI. Jednotlivé vzorky byly ve stejný den pro srovnání pozorovány CLSM a epifluorescenčním mikroskopem.

4.6.2.1 Včely krmené R19S

V případě krmení včel sacharosou obsahující R19S byl nejvyšší fluorescenční signál dle očekávání ve skupině s přidavkem uracilu (Obr. 24 a 25). Uracil spouští aktivaci Duox, a tedy i tvorbu HClO v lumenu střev. HClO pak přímo reaguje s R19S, které je v trávicí soustavě přítomné z krmení, za tvorby vysoce fluoreskující R19. U kontrolní a mock skupiny nebyl pozorován tak silný fluorescenční signál, většina fluorescence pocházela z pylových zrn, popř. metabolitů v trávicí soustavě. Ve skupinách, kde bylo přítomné R19S, vykazovaly přítomnost fluorescence také Malpighiho trubice a vzdušnice (patrné u snímku mock skupiny z CLSM).



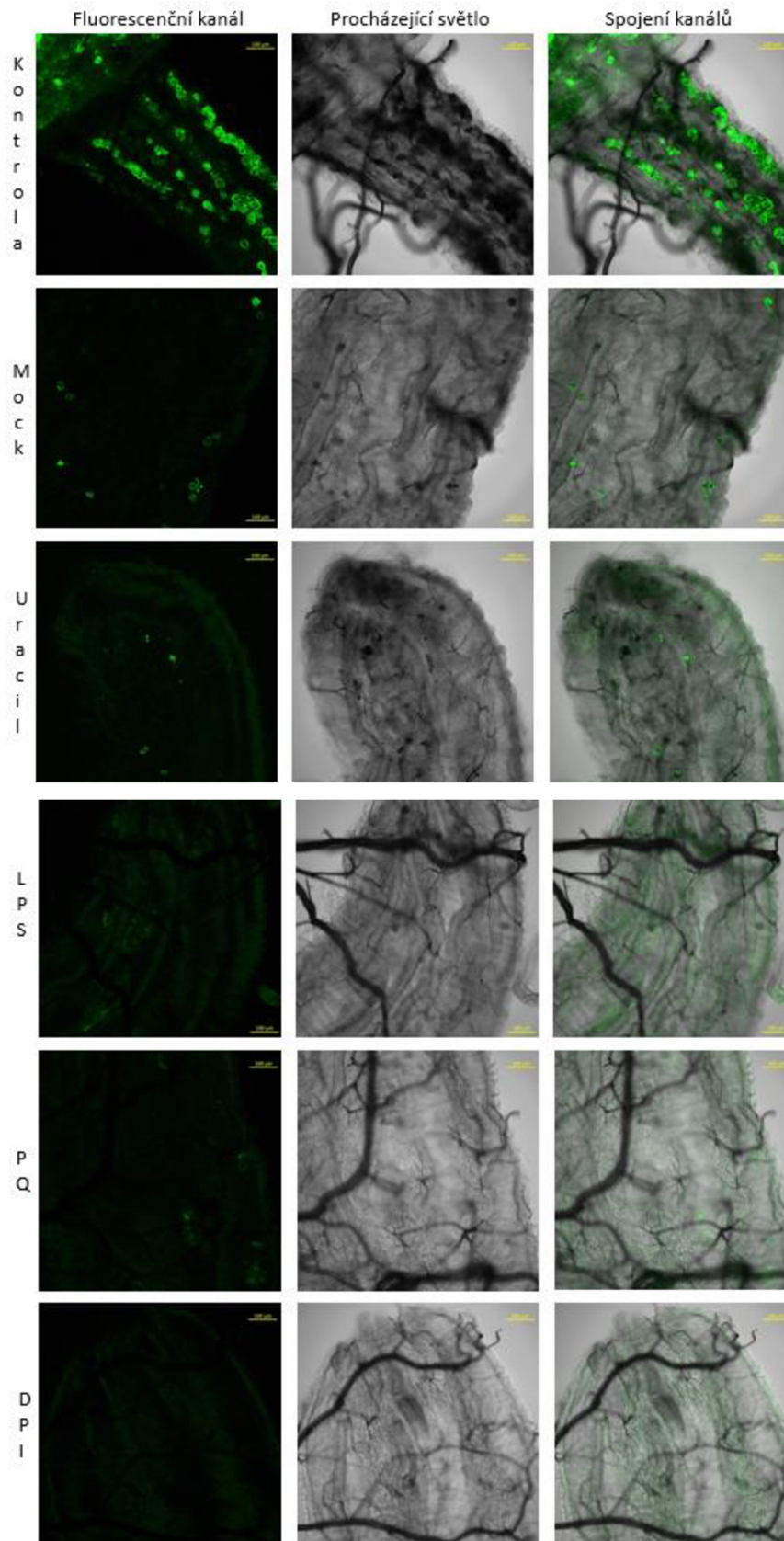
Obr. 24: Střeva včel ze skupiny krmené 50% sacharosou (kontrola), 20 μ M R19S v 50% sacharose (mock) a R19S s přídavkem 1mM uracilu 1 h před fixací. Snímky byly pořízené CLSM excitací při 488 nm, emisní oblast byla nastavena na 520-580 nm, měřítko = 100 μ m.



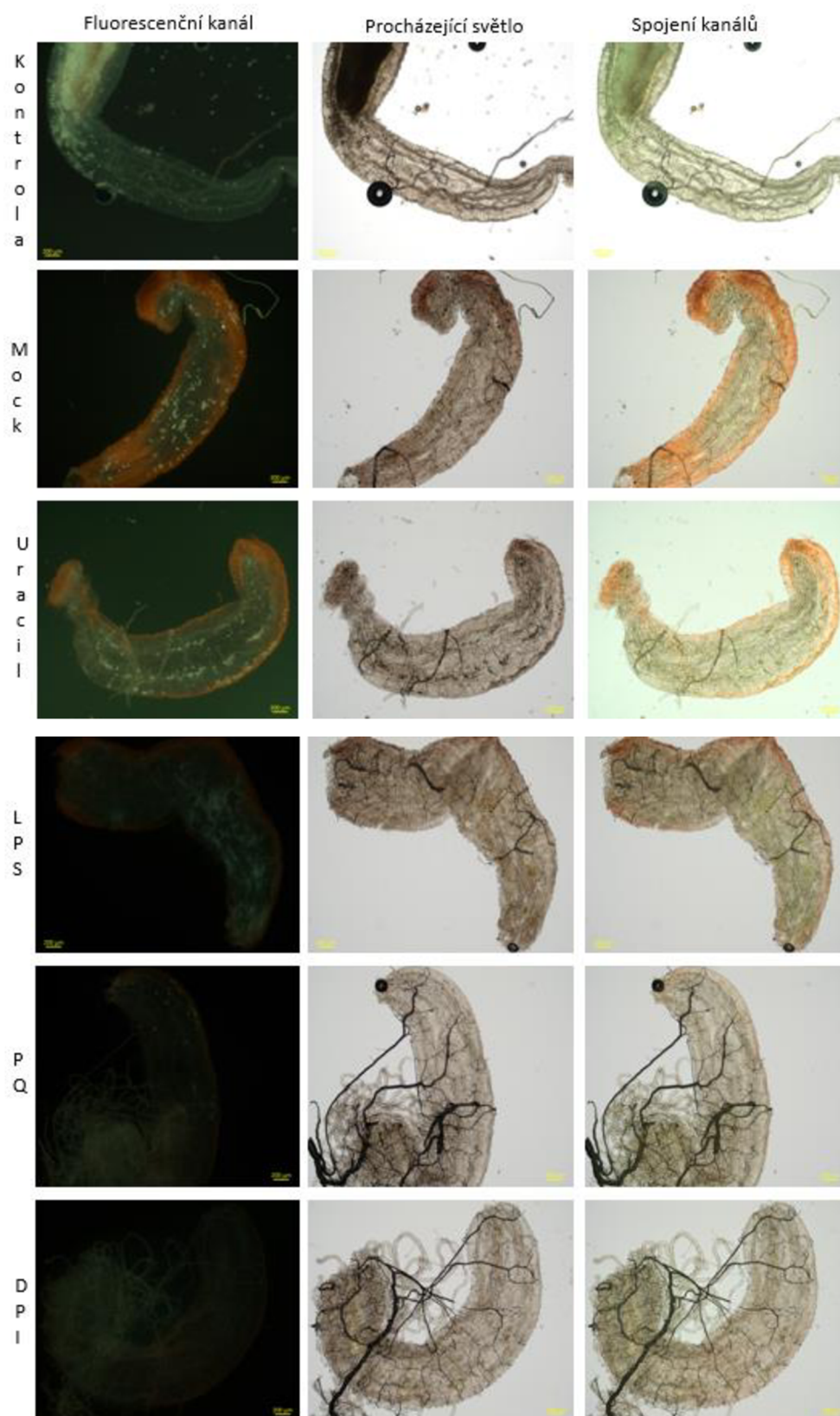
Obr. 25: Střeva včel ze skupiny krmené 50% sacharosou (kontrola), 20 μ M R19S v 50% sacharose (mock) a R19S s přidavkem 1mM uracilu 1 h před fixací. Snímky byly pořízené epifluorescenčním mikroskopem excitací při 475 nm, měřítko = 200 μ m.

4.6.2.2 Střeva včel inkubovaná s R19S

Fluorescence střev včel inkubovaných s R19S byla u vzorků inkubovaných s uracilem oproti skupině krmené R19S méně výrazná (Obr. 26 a 27). Nedá se říct, že by tyto vzorky vykazovaly stejný vzor fluorescence jako střeva včel přímo krmených R19S s přidavkem uracilu. Ani přidavek LPS, PQ nebo DPI nevedl k signifikantně vyšším hodnotám fluorescence. Ta je ve střevech pravděpodobně způsobena šumem nebo přímým signálem pylu, ten v těchto vzorcích také vykazuje nejvyšší fluorescenci (viz Obr. 26 – kontrola). Zajímavá je také přítomnost červené fluorescence, která byla pozorována epifluorescenčním mikroskopem (Obr. 27 – vzorky s R19S). Tento vzor podél epitelu by odpovídal slabému signálu fluorescence pozorovaném CLSM – veškerý signál pozorovaný CLSM byl počítačově převeden na zelenou barvu (Obr. 26 – vzorky s R19S).



Obr. 26: Střeva včel ze skupiny inkubované 1 h v PBS pufru (kontrola), PBS pufru s 20 μ M R19S (mock), PBS pufru s 20 μ M R19S a 1mM uracilem, 30 μ g·ml⁻¹ LPS, 25 μ M PQ a 0,1mM DPI. Snímky byly pořízené CLSM excitací při 488 nm, emisní oblast byla nastavena na 520-580 nm, měřítko = 100 μ m.



Obr. 27: Střeva včel ze skupiny inkubované 1 h v PBS pufru (kontrola), PBS pufru s 20 μ M R19S (mock), PBS pufru s 20 μ M R19S a 1mM uracilem, 30 μ g·ml⁻¹ LPS, 25 μ M PQ a 0,1mM DPI. Snímky byly pořízené epifluorescenčním mikroskopem excitací při 475 nm, měřítko = 200 μ m.

5 Diskuze

Vyhodnocení aktivity Nox/Duox a koncentrace H_2O_2 je komplexní úkol z pohledu navržení experimentů, tak i analýzy výsledků. Hned prvním problémem mohou být rozdílné koncentrace proteinů u jednotlivých skupin včel. Vzhledem ke vztažení koncentrace naměřeného H_2O_2 na obsah proteinů ve vzorcích je přesná koncentrace proteinů klíčová k validním výsledkům. U jednotlivých skupin včel však byly naměřené rozdílné koncentrace proteinů, největší podíl na tom má už samotný typ vzorků – trávicí soustavy. Obvyklým postupem při měření parametrů v zadečku včel je vyjmutí trávicí soustavy před homogenizací, což v této práci nebylo možné, jelikož se právě v trávicí soustavě nachází cílové enzymy. Každá včela tak měla jinak naplněnou trávicí soustavu potravou, což se projevilo na naměřené koncentraci proteinů (mělo by se to ovšem zprůměrovat při použití většího množství včel). Pyl má navíc vysoký obsah proteinů, což může interferovat s Bradfordovou metodou. Včely mají navíc vyvinuté sociální chování a často se stává, že z různých důvodů přestanou přijímat potravu, nebo ji zadržují. Dalším důvodem mohly být rozdíly vzniklé při homogenizaci. V různé dny byly naměřeny poměrně vysoké rozdíly při kvantifikaci proteinů. Hlavním důvodem bylo naředění menšího objemu vzorku před měřením a neúplná homogenita vzorku.

Při srovnávání fluorescenčních prób byla nejdůležitější vlastností specifická – oxidovatelnost ideálně pouze HRP, a ne světlem či jinými oxidoreduktasami ve vzorku. Ze tří používaných fluorescenčních prób používaných ve spřažené reakci s HRP byly pro měření ve vzorcích homogenátů včel dvě nevhodné – HVA a skopoletin. Ty byly v minulosti používány pro měření extracelulárně uvolněných ROS v buněčných kulturách (převážně lidských fagocytů). Nejslibnější výsledky byly u experimentů s denaturací vzorků, kdy byl naměřený rozdíl mezi nespecifickou a specifickou oxidací všech prób nejvyšší. Tyto výsledky jsou analogické k Paital (2014), který před měřením s HVA a HRP precipitoval proteiny v homogenátu kyselinou trichloroctovou. Dosáhl vyšších naměřených koncentrací H_2O_2 . Bylo by tedy vhodné srovnat denaturaci proteinů s jejich precipitací např. při dalších měření s AR.

Mezi další významný problém metody se skopoletinem je shoda excitačního a emisního spektra se substrátem Nox/Duox – NADPH (excitace při 340 ± 30 nm a emise 460 ± 50 nm). Ginabreda *et al.* (2008) tento problém řešili přidávkou HCl k odstranění zbývajícího NADPH. Tato optimalizace byla vyzkoušena a vedla ke snížení fluorescence, což ale při metodě se skopoletinem znamená vyšší koncentraci H_2O_2 a interpretace

výsledků se tedy ještě ztížila. Kromě toho přidavek HCl vede ke drastickému snížení pH (z pH 7,5 na 2,3), přidavek stop pufru poté pH vzorku vrátí na cca pH 9,6, což je oblast druhého excitačního maxima skopoletinu při 380 nm (Pham *et al.*, 2020). Pokusy s přidáním HCl k zastavení reakcí u AR a HVA vedly k nekonzistentním výsledkům. Bez stop pufru došlo k drastickému snížení fluorescenčního výtěžku, po přidání stop pufru pak k vysoké a zdánlivě náhodné variabilitě výsledků. Tato zjištění se shodují s informacemi uváděnými Invitrogenem – AR a resorufin jsou stabilní v úzkém rozmezí pH 7-8 a při pH vyšším než 8,5 je AR vysoce nestabilní.

Výsledky této práce se dále neshodují s Mishin *et al.* (2020), kteří uvádějí, že přítomnost SOD při reakci s AR a HRP vede k vyšším naměřeným koncentracím H₂O₂. Jejich měření však byla provedena v čistých kulturách jaterních mikrosomů, kde O₂⁻ vytvořený interakcí NADPH a HRP (avšak pouze za vysokých koncentrací), byl inhibován právě přítomností SOD, aniž by došlo k ovlivnění enzymů produkujících H₂O₂.

Naopak Votyakova a Reynolds (2004) uvádějí, že přítomnost SOD a CAT v reakčních směsích interferuje s oxidací AR. To by vysvětlovalo nižší naměřené koncentrace H₂O₂ ve vzorcích se SOD. Bylo by tedy vhodné provést po inkubaci ještě denaturační reakci. Zjistili bychom tak, jestli SOD ve vzorku brání oxidaci AR a zároveň, jestli jeho přítomnost v reakci zvyšuje hladinu H₂O₂ (O₂⁻ vyprodukovaný Nox by byl převeden na H₂O₂).

Variabilita některých výsledků měření koncentrace H₂O₂ včel inokulovaných LPS a PQ metodou s AR může být kromě chyb při pipetování vysvětlena vystavením AR světlu a vzduchu. Zhao *et al.* (2012) uvádějí náchylnost AR k fotooxidaci, která může vést k menší citlivosti metody.

Co se týče včel inokulovaných PQ a LPS – starší včely (2-5 d) vykazovaly oproti mladším včelám (1-2 d) vyšší hodnoty koncentrace H₂O₂ v trávicí soustavě. Mohlo by to souviset s tím, že enzymy Nox/Duox jsou u nich aktivní, zatímco antioxidační systémy jsou syntetizovány později. Dále by zvyšování aktivity Nox/Duox u včel vystavených LPS mohlo naznačovat spuštění IMD dráhy, která vede k syntéze Duox. Kaneko *et al.* (2004) ovšem u octomilek zaznamenali opak, vystavení LPS nevede ke spuštění IMD dráhy (na rozdíl od vystavení PG). Naopak bylo potvrzeno, že PQ u včel navozuje oxidativní stres, na který organismus reaguje syntézou antioxidačních enzymů (Kojic *et al.*, 2019). Oxidativní stres může být dále alespoň částečně neutralizován přítomností pylu v trávicí soustavě (De Mattos *et al.*, 2018). Pylová zrna ovšem obsahují vlastní

enzymy z rodiny Nox/Duox (Csillag *et al.*, 2010). Bylo by tedy vhodné zjistit, jakým způsobem může pyl interferovat při měřeních.

Oliveira *et al.* (2011) navrhli, že kontrolované snížení hladiny ROS v trávicích soustavách komárů je adaptací na přítomnost hemu. Hem je prooxidativní molekula, která vzniká ve vysoké koncentraci degradací hemoglobinu. Je schopný reagovat s hydroperoxydy za tvorby cytotoxických produktů a pro organismus je tedy výhodnější snížit hladinu ROS než podstupovat zátěž v podobě oxidativního poškození lipidů. Vzhledem k tomu, že pyl kromě neutralizace PQ také vykazuje prooxidativní aktivitu, by bylo zajímavé zjistit, jestli mají včely podobný mechanismus po požití pylu (Csillag *et al.*, 2010).

Dále by bylo vhodné porovnat efekt klasického PQ s tzv. MitoPQ. Normální PQ vytváří $O_2^{\cdot-}$ v chloroplastech rostlin za přítomnosti světla a pro živočichy je toxický, vytváří také např. nekyslíkové radikály (Williams *et al.*, 2016). Naopak MitoPQ vytváří ROS specificky v mitochondriích.

Kromě stanovení koncentrace H_2O_2 a aktivity Nox/Duox by tedy bylo vhodné provést měření změn genové exprese Nox/Duox a antioxidačních enzymů metodou qPCR a jejich abundanci metodou Western blot.

Sacharosa s PQ a LPS byla včelám dostupná po celou dobu experimentu (až 48 h), bylo by ale zajímavé provést i jednorázové krmení a sledovat případnou změnu v tvorbě ROS v krátkém časovém úseku po inokulaci. Naopak by bylo vhodné provést i dlouhodobější expozici různým elicitorům (nejen PQ a LPS) a sledovat parametry jako úmrtnost včel, markery oxidativního poškození a antioxidační aktivity.

Pro výzkum včel jsou octomilky dobrým modelovým organismem vzhledem k ortologii mnoha genů zapojených do imunity a signalizace. Problém může nastat při srovnávání imunitních procesů ve střevech, která jsou u obou druhů jinak organizovaná a obydlená jiným typem bakterií. Prvním z rozdílů je i odlišná terminologie – zatímco u octomilek znamená „midgut“ střední střevo, u včel se pod tímto pojmem označuje žaludek. To značně ztěžuje srovnání lokalizace Duox (potažmo HClO metodou s R19S) v trávicí soustavě, která je navíc u octomilek podstatně menší a bez fluoreskujícího pylu. Tato práce je tedy zaměřena především na oblast střeva včel, které je pro mikroskopii nejvhodnější. Podařilo se dosáhnout stejných výsledků, jaké prokázali Lee *et al.* (2013), Chen *et al.* (2016) a Hachfi *et al.* (2019) na octomilkách – určil podávaný ve stravě (nebo uvolňovaný bakteriemi) funguje jako elicitor Duox, které do lumenu střev produkují HClO. Dále byla pozorována fluorescence (patrně R19)

v Malpighiho trubicích a vzdušnicích, což souhlasí s potvrzením lokalizace Duox v těchto orgánech, které provedli Hu *et al.* (2013) u *B. mori*. Evolučním vysvětlením by byla mikrobicidní funkce – ve vzdušnicích včel se totiž mohou nacházet roztoči (např. roztočík včelí *Acarapis woodi*) (Sammataro *et al.* 2015). Naopak inkubace izolovaných střev včel s R19S nevedla ke stejným výsledkům, ať už je to neprostupností trávicí soustavy pro R19S a uracil (či další použité látky) nebo degradací enzymů během inkubace *in vitro*. Zajímavý byl ovšem nálezný červeného zbarvení podél epitelu střev při pozorování epifluorescenčním mikroskopem, mohlo by se jednat např. o R19S či jeho derivát. R19S má totiž podobnou barvu (R19 naopak fluoreskuje jasně světle zeleně).

Většina studií zabývajících se oxidativním stresem u včel se zaměřuje na antioxidační enzymy, ale původ a časová osa tvorby ROS ve studiích není zkoumaný (Olgun *et al.*, 2020).

Práce v laboratoři pod kontrolovanými podmínkami s dělnicemi včely medonosné je velmi složitá kvůli jejich „závislosti“ na feromonu včelích matek. Bez něj dochází kromě ovlivnění stresových a imunitních reakcí také k potlačení normálního chování a sociální hierarchie.

Ratiu *et al.* (2016) uvádí, že akutní stres (nejen) u včel stimuluje imunitní systém, zatímco chronický stres ho potlačuje. Tento jev může být výhodný k obraně proti jednomu typu infekce, zatímco nevýhodný proti jinému. Dělnice byly v této studii vystaveny různým typům stresorů – od odebrání z úlu a separaci od zbytku včelstva a matky po transport. Právě feromony uvolňované matkou působí na včelstvo uklidňujícím efektem. Je tedy třeba brát v potaz, že studium relativních rozdílů expresí enzymů zapojených do imunitních drah včel (dorsal, Toll-1, Relish a Duox) může být ovlivněno stresem a nepřítomností matek.

Brown *et al.* (2022) dále testovali ovlivnění délky života dělnic v laboratorních podmínkách. Zimní včely přechovávané v klíčkách v laboratoři vykazovaly zkrácenou délku života. V normálních podmínkách žijí 150 i více dní, zatímco v laboratoři se včely dožívaly maximálně 70 dní. Nebrání v potaz nerealistické životní podmínky sociálního hmyzu je tedy zásadní nedostatek experimentů zabývajících se různým ovlivněním na délku života a imunitu včel. Tato zjištění navíc vedou pozornost k otázkám převedení výsledků laboratorních testů do praxe. Včelstvo v úlech má naprosto jiné podmínky (strava, dělba práce, přítomnost mateřského feromonu, změna teploty atd.). I přes snahu randomizovat dělnice (srovnání genetické variace mezi včelstvy) po imitování podmínek úlu se stále mnoho podmínek v laboratoři liší od těch přirozených.

6 Závěr

Metody kvantifikace ROS v biologických vzorcích mají mnohá úskalí. Vzhledem k náročnosti práce s ROS kvůli jejich rychlému poločasu rozpadu a reaktivitě je k nim nutné přistupovat komplexně. V současnosti nelze jednoduše a spolehlivě zachytit hladiny všech typů ROS včetně jejich funkcí v organismech. Kvantifikace ROS je navíc relativní – aktivita Nox/Duox či jiných enzymů zapojených do metabolismu ROS stanovená v extraktech nebo homogenátech tkání nemusí odpovídat skutečné aktivitě enzymů ve vzorcích. Aktivita enzymů produkujících ROS navíc nemusí přímo souviset s koncentrací ROS (vzhledem k aktivitě antioxidačních enzymů). Stále tak dochází k modifikacím metod měření ROS, vývoji specifických inhibitorů enzymů a v neposlední řadě využití metody RNAi pro specifické testování funkce enzymů v regulaci ROS.

Při srovnávání fluorescenčních prób AR, HVA a skopoletinu historicky využívaných ke kvantifikaci H_2O_2 bylo dosaženo těchto závěrů:

- Skopoletin a HVA jsou jako fluorimetrické próby v homogenátu nevhodné;
- AR se naopak jeví jako nejvhodnější próba pro kvantifikaci H_2O_2 , je nejvíce specifická a citlivá i s použitím HRP s nižší aktivitou;
- SOD pravděpodobně interferuje s reakcí HRP a fluorescenční próby;
- DPI lze využít jako inhibitor aktivity Nox/Duox v homogenátu, bylo by vhodné testovat využití pro zastavení antimikrobiální funkce Duox při inokulaci včel patogeny.

Dále byla metodou s AR srovnána koncentrace H_2O_2 ve vzorcích z trávicích soustav různě starých včel inokulovaných PQ a LPS před a po inkubaci s NADPH:

- PQ vyvolal zvýšení koncentrace H_2O_2 pouze po 2 h a v koncentraci 25 mM, v této skupině byla naměřena nejvyšší koncentrace H_2O_2 vůbec; naopak zvýšená aktivita Nox/Duox byla pozorována po 4 h u skupiny ovlivněné 50mM PQ a po 8 h u skupiny ovlivněné 25mM PQ;
- U včel vystavených 24 h LPS byla nejvyšší hladina H_2O_2 naměřena u 2-3 d starých včel (i u kontroly), v jednotlivých skupinách podle stáří však po vystavení LPS nedošlo ke zvýšení koncentrace H_2O_2 ; aktivita Nox/Duox v těchto skupinách byla oproti kontrole zvýšená u všech stáří včel i koncentrací (nejvíce opět u 2-3d včel);
- Stejný trend byl naměřen i po 48 h – starší včely vykazovaly vyšší bazální hladinu H_2O_2 ; aktivita Nox/Duox byla zvýšena opět nejvíce u 2-3d včel při vystavení všem koncentracím LPS.

Byla testována histochemická detekce HClO (produktu Duox) v tkáních včel metodou s R19S při různých parametrech:

- Byl prokázán aktivační vliv přítomnosti uracilu v potravě na tvorbu HClO ve střevech včel;
- Naopak inkubace střev *in vitro* s uracilem či jinými látkami, které by mohly ovlivňovat funkci Duox, nevedla ke stejným výsledkům;
- Největším problémem při této metodě je fluorescence pylových zrn, které emitují světlo při stejných vlnových délkách jako R19.

Další práci by bylo vhodné zaměřit na provedení dalších analýz týkajících se Nox/Duox včel – imunohistochemicky zjistit, kde přesně v trávicí soustavě se nachází Nox a Duox, dále změřit jejich genovou expresi a abundanci v různých tkáních metodami qPCR a Western blot během vývoje a během vystavení včel různým patogenům nebo elicitorům.

Zajímavé by bylo také spojit tyto metody s měřením aktivity a exprese NOS a AMP, vzhledem ke spolupráci těchto prvků imunity. V neposlední řadě se nabízí řada otázek ohledně funkce těchto systémů v trávicí soustavě při napadení včel patogeny na délku života včel a složení mikrobiomu.

7 Literatura

- AHN, Hye-Mi, Kyu-Sun LEE, Dong-Seok LEE a Kweon YU, 2012. JNK/FOXO mediated PeroxiredoxinV expression regulates redox homeostasis during *Drosophila melanogaster* gut infection. *Developmental & Comparative Immunology* [online]. **38**(3), 466-473. ISSN 0145305X. Dostupné z: doi:10.1016/j.dci.2012.07.002
- ALBRETT, Amelia M., Louisa V. ASHBY, Nina DICKERHOF, Anthony J. KETTLE a Christine C. WINTERBOURN, 2018. Heterogeneity of hypochlorous acid production in individual neutrophil phagosomes revealed by a rhodamine-based probe. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **293**(40), 15715-15724. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.RA118.004789
- AMDAM, Gro V., Anne Lene T.O. AASE, Siri-Christine SEEHUUS, M. KIM FONDRK, Kari NORBERG a Klaus HARTFELDER, 2005. Social reversal of immunosenescence in honey bee workers. *Experimental Gerontology* [online]. **40**(12), 939-947. ISSN 05315565. Dostupné z: doi:10.1016/j.exger.2005.08.004
- AMEZIANE-EL-HASSANI, Rabii, Stanislas MORAND, Jean-Luc BOUCHER, et al., 2005. Dual Oxidase-2 Has an Intrinsic Ca²⁺-dependent H₂O₂-generating Activity. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **280**(34), 30046-30054. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M500516200
- ANH, Nguyen Thi Tu, Maiko NISHITANI, Shigeharu HARADA, Masamitsu YAMAGUCHI a Kaeko KAMEI, 2011. Essential Role of Duox in Stabilization of *Drosophila* Wing. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **286**(38), 33244-33251. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M111.263178
- AYYAZ, Arshad, Hongjie LI a Heinrich JASPER, 2015. Haemocytes control stem cell activity in the *Drosophila* intestine. *Nature Cell Biology* [online]. **17**(6), 736-748. ISSN 1465-7392. Dostupné z: doi:10.1038/ncb3174
- AZZOUZ-OLDEN, Farida, Arthur HUNT a Gloria DEGRANDI-HOFFMAN, 2018. Transcriptional response of honey bee (*Apis mellifera*) to differential nutritional status and *Nosema* infection. *BMC Genomics* [online]. **19**(1). ISSN 1471-2164. Dostupné z: doi:10.1186/s12864-018-5007-0
- BÁNFI, Botond, Gergely MOLNÁR, Andres MATURANA, Klaus STEGER, Balázs HEGEDŰS, Nicolas DEMAUREX a Karl-Heinz KRAUSE, 2001. A Ca²⁺-activated NADPH Oxidase in Testis, Spleen, and Lymph Nodes. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **276**(40), 37594-37601. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M103034200
- BERGIN, David, Marc BRENNAN a Kevin KAVANAGH, 2003. Fluctuations in haemocyte density and microbial load may be used as indicators of fungal pathogenicity in larvae of *Galleria mellonella*. *Microbes and Infection* [online]. **5**(15), 1389-1395. ISSN 12864579. Dostupné z: doi:10.1016/j.micinf.2003.09.019
- BERGIN, David, Emer P. REEVES, Julie RENWICK, Frans B. WIENTJES a Kevin KAVANAGH, 2005. Superoxide Production in *Galleria mellonella* Hemocytes: Identification of Proteins Homologous to the NADPH Oxidase Complex of Human Neutrophils. *Infection and Immunity* [online]. **73**(7), 4161-4170. ISSN 0019-9567. Dostupné z: doi:10.1128/IAI.73.7.4161-4170.2005
- BROWNE, Niall, Michelle HEELAN a Kevin KAVANAGH, 2013. An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes. *Virulence* [online]. **4**(7), 597-603. ISSN 2150-5594. Dostupné z: doi:10.4161/viru.25906
- BUCHON, N., N. A. BRODERICK, S. CHAKRABARTI a B. LEMAITRE, 2009. Invasive and indigenous microbiota impact intestinal stem cell activity through multiple pathways in *Drosophila*. *Genes & Development* [online]. **23**(19), 2333-2344. ISSN 0890-9369. Dostupné z: doi:10.1101/gad.1827009
- BUCHON, Nicolas, Nichole A. BRODERICK a Bruno LEMAITRE, 2013. Gut homeostasis in a microbial world: insights from *Drosophila melanogaster*. *Nature Reviews Microbiology* [online]. **11**(9), 615-626. ISSN 1740-1526. Dostupné z: doi:10.1038/nrmicro3074
- CI, Yun-Xiang a Fang WANG, 1991. Catalytic effects of peroxidase-like metalloporphyrins on the fluorescence reaction of homovanillic acid with hydrogen peroxide. *Fresenius' Journal of*

- Analytical Chemistry* [online]. **339**(1), 46-49. ISSN 0937-0633. Dostupné z: doi:10.1007/BF00324758
- CSILLAG, Aniko, Istvan BOLDOGH, Kitti PAZMANDI, Zoltan MAGYARICS, Peter GOGOLAK, Sanjiv SUR, Eva RAJNAVOLGYI a Attila BACSI, 2010. Pollen-Induced Oxidative Stress Influences Both Innate and Adaptive Immune Responses via Altering Dendritic Cell Functions. *The Journal of Immunology* [online]. **184**(5), 2377-2385. ISSN 0022-1767. Dostupné z: doi:10.4049/jimmunol.0803938
- DADD, R. H., 1973. Insect Nutrition: Current Developments and Metabolic Implications. *Annual Review of Entomology* [online]. **18**(1), 381-420. ISSN 0066-4170. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.en.18.010173.002121
- DE DEKEN, Xavier, Dantong WANG, Jacques E. DUMONT a Françoise MIOT, 2002. Characterization of ThOX Proteins as Components of the Thyroid H₂O₂-Generating System. *Experimental Cell Research* [online]. **273**(2), 187-196. ISSN 00144827. Dostupné z: doi:10.1006/excr.2001.5444
- DE GREGORIO, Ennio, Paul T. SPELLMAN, Phoebe TZOU, Gerald M. RUBIN a Bruno LEMAITRE, 2002. The Toll and Imd pathways are the major regulators of the immune response in *Drosophila*. *The EMBO Journal* [online]. **21**(11), 2568-2579. ISSN 14602075. Dostupné z: doi:10.1093/emboj/21.11.2568
- DE MATTOS, Igor Medici, Ademilson E. E. SOARES a David R. TARPY, 2018. Mitigating effects of pollen during paraquat exposure on gene expression and pathogen prevalence in *Apis mellifera* L. *Ecotoxicology* [online]. **27**(1), 32-44. ISSN 0963-9292. Dostupné z: doi:10.1007/s10646-017-1868-2
- DHAR, Sanjit K., Timothy SCOTT, Chi WANG, Teresa.W.M. FAN a Daret K. ST CLAIR, 2022. Mitochondrial superoxide targets energy metabolism to modulate epigenetic regulation of NRF2-mediated transcription. *Free Radical Biology and Medicine* [online]. **179**, 181-189. ISSN 08915849. Dostupné z: doi:10.1016/j.freeradbiomed.2021.12.309
- DIAS, Felipe A., Ana Caroline P. GANDARA, Fernanda G. QUEIROZ-BARROS, Raquel L.L. OLIVEIRA, Marcos H.F. SORGINE, Glória R.C. BRAZ a Pedro L. OLIVEIRA, 2013. Ovarian Dual Oxidase (Duox) Activity Is Essential for Insect Eggshell Hardening and Waterproofing. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **288**(49), 35058-35067. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M113.522201
- DICKINSON, Bryan C a Christopher J CHANG, 2011. Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. *Nature Chemical Biology* [online]. **7**(8), 504-511. ISSN 1552-4450. Dostupné z: doi:10.1038/nchembio.607
- DOUBLET, Vincent, Maureen LABARUSSIAS, Joachim R. DE MIRANDA, Robin F. A. MORITZ a Robert J. PAXTON, 2015. Bees under stress: sublethal doses of a neonicotinoid pesticide and pathogens interact to elevate honey bee mortality across the life cycle. *Environmental Microbiology* [online]. **17**(4), 969-983. ISSN 14622912. Dostupné z: doi:10.1111/1462-2920.12426
- DOUBLET, Vincent, Yvonne POESCHL, Andreas GOGOL-DÖRING, et al., 2017. Unity in defence: honeybee workers exhibit conserved molecular responses to diverse pathogens. *BMC Genomics* [online]. **18**(1). ISSN 1471-2164. Dostupné z: doi:10.1186/s12864-017-3597-6
- DU, Eun Jo, Tae Jung AHN, Xianlan WEN, et al., 2016. Nucleophile sensitivity of *Drosophila* TRPA1 underlies light-induced feeding deterrence. *ELife* [online]. **5**. ISSN 2050-084X. Dostupné z: doi:10.7554/eLife.18425
- DUTTA, Devanjali, Adam J. DOBSON, Philip L. HOUTZ, et al., 2015. Regional Cell-Specific Transcriptome Mapping Reveals Regulatory Complexity in the Adult *Drosophila* Midgut. *Cell Reports* [online]. **12**(2), 346-358. ISSN 22111247. Dostupné z: doi:10.1016/j.celrep.2015.06.009
- EL MOHANDÉS, Sawsan, Emad NAFEA a Asmaa FAWZY, 2010. Effect of different feeding diets on the haemolymph of the newly emerged honeybee workers *Apis mellifera* L. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences. A, Entomology* [online]. **3**(1), 113-220. ISSN 2090-0813. Dostupné z: doi:10.21608/eajbsa.2010.15257

- EVANS, J. D., K. ARONSTEIN, Y. P. CHEN, et al., 2006. Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology* [online]. **15**(5), 645-656. ISSN 0962-1075. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2583.2006.00682.x
- FOLEY, Edan a Patrick H. O'FARRELL, 2003. Nitric oxide contributes to induction of innate immune responses to gram-negative bacteria in *Drosophila*. *Genes & Development* [online]. **17**(1), 115-125. ISSN 0890-9369. Dostupné z: doi:10.1101/gad.1018503
- FREE, J. B., 1965. The effect on pollen collection of feeding honey-bee colonies with sugar syrup. *The Journal of Agricultural Science* [online]. **64**(2), 167-168. ISSN 0021-8596. Dostupné z: doi:10.1017/S0021859600064728
- GÁBOR, Erika, Gyöngyi CINEGE, Gábor CSORDÁS, et al., 2020. Identification of reference markers for characterizing honey bee (*Apis mellifera*) hemocyte classes. *Developmental & Comparative Immunology* [online]. **109**. ISSN 0145305X. Dostupné z: doi:10.1016/j.dci.2020.103701
- GALLO, Richard L. a Lora V. HOOPER, 2012. Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nature Reviews Immunology* [online]. **12**(7), 503-516. ISSN 1474-1733. Dostupné z: doi:10.1038/nri3228
- GANDARA, Ana Caroline Paiva, André TORRES, Ana Cristina BAHIA, Pedro L. OLIVEIRA a Renata SCHAMA, 2017. Evolutionary origin and function of NOX4-art, an arthropod specific NADPH oxidase. *BMC Evolutionary Biology* [online]. **17**(1). ISSN 1471-2148. Dostupné z: doi:10.1186/s12862-017-0940-0
- GANDARA, Ana Caroline P., Felipe A. DIAS, Paula C. DE LEMOS, Renata STIEBLER, Ana Cristina S. BOMBAÇA, Rubem MENNA-BARRETO a Pedro L. OLIVEIRA, 2021. "Urate and NOX5 Control Blood Digestion in the Hematophagous Insect *Rhodnius prolixus*". *Frontiers in Physiology* [online]. **12**. ISSN 1664-042X. Dostupné z: doi:10.3389/fphys.2021.633093
- GÄTSCHENBERGER, Heike, Klara AZZAMI, Jürgen TAUTZ, Hildburg BEIER a Muriel MOSER, 2013. Antibacterial Immune Competence of Honey Bees (*Apis mellifera*) Is Adapted to Different Life Stages and Environmental Risks. *PLoS ONE* [online]. **8**(6). ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0066415
- GEISZT, Miklós, Kristen LEKSTROM, Jassir WITTA a Thomas L. LETO, 2003. Proteins Homologous to p47 and p67 Support Superoxide Production by NAD(P)H Oxidase 1 in Colon Epithelial Cells. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **278**(22), 20006-20012. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M301289200
- GEISZT, Miklós a Thomas L. LETO, 2004. The Nox Family of NAD(P)H Oxidases: Host Defense and Beyond. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **279**(50), 51715-51718. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.R400024200
- GINABREDA, Maria Gloria P, Luciene C CARDOSO, Flavia M NOBREGA, Andrea C F FERREIRA, Manuel Domingos C GONÇALVES, Mário VAISMAN a Denise P CARVALHO, 2008. Negative correlation between thyroperoxidase and dual oxidase H2O2-generating activities in thyroid nodular lesions. *European Journal of Endocrinology* [online]. **158**(2), 223-227. ISSN 0804-4643. Dostupné z: doi:10.1530/EJE-07-060
- HA, Eun-Mi, Chun-Taek OH, Yun Soo BAE a Won-Jae LEE, 2005. A Direct Role for Dual Oxidase in *Drosophila* Gut Immunity. *Science* [online]. **310**(5749), 847-850. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.1117311
- HA, Eun-Mi, Kyung-Ah LEE, You Yeong SEO, Sung-Hee KIM, Jae-Hong LIM, Byung-Ha OH, Jaesang KIM a Won-Jae LEE, 2009. Coordination of multiple dual oxidase-regulatory pathways in responses to commensal and infectious microbes in *drosophila* gut. *Nature Immunology* [online]. **10**(9), 949-957. ISSN 1529-2908. Dostupné z: doi:10.1038/ni.1765.
- HACHFI, Salma, Olivia BENGUETTAT a Armel GALLET, 2019. Hypochlorous Acid Staining with R19-S in the *Drosophila* Intestine upon Ingestion of Opportunistic Bacteria. *BIO-PROTOCOL* [online]. **9**(10). ISSN 2331-8325. Dostupné z: doi:10.21769/BioProtoc.3246
- HERB, Marc, Alexander GLUSCHKO a Michael SCHRAMM, 2021. Reactive Oxygen Species: Not Omnipresent but Important in Many Locations. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* [online]. **9**. ISSN 2296-634X. Dostupné z: doi:10.3389/fcell.2021.716406

- HOFFMANN, Jules A, 1995. Innate immunity of insects. *Current Opinion in Immunology* [online]. **7**(1), 4-10. ISSN 09527915. Dostupné z: doi:10.1016/0952-7915(95)80022-0
- HOFFMANN, Jules A. a Jean-Marc REICHHART, 2002. Drosophila innate immunity: an evolutionary perspective. *Nature Immunology* [online]. **3**(2), 121-126. ISSN 1529-2908. Dostupné z: doi:10.1038/ni0202-121
- HSIEH, Yu-Shan a Chin-Yuan HSU, 2013. Oxidative Stress and Anti-Oxidant Enzyme Activities in the Trophocytes and Fat Cells of Queen Honeybees (*Apis mellifera*). *Rejuvenation Research* [online]. **16**(4), 295-303. ISSN 1549-1684. Dostupné z: doi:10.1089/rej.2013.1420
- HSU, Chin-Yuan a Yu-Shan HSIEH, 2014. Oxidative stress decreases in the trophocytes and fat cells of worker honeybees during aging. *Biogerontology* [online]. **15**(2), 129-137. ISSN 1389-5729. Dostupné z: doi:10.1007/s10522-013-9485-9
- HU, Xiaolong, Rui YANG, Xing ZHANG, Lin CHEN, Xingwei XIANG, Chengliang GONG, Xiaofeng WU a Pedro Lagerblad OLIVEIRA, 2013. Molecular Cloning and Functional Characterization of the Dual Oxidase (BmDuox) Gene from the Silkworm *Bombyx mori*. *PLoS ONE* [online]. **8**(8). ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0070118
- CHAKRABARTI, Sveta, Mickaël POIDEVIN, Bruno LEMAITRE a Danielle A. GARSIN, 2014. The Drosophila MAPK p38c Regulates Oxidative Stress and Lipid Homeostasis in the Intestine. *PLoS Genetics* [online]. **10**(9). ISSN 1553-7404. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pgen.1004659
- CHEN, Xiaoqiang, Kyung-Ah LEE, Eun-Mi HA, et al., 2011. A specific and sensitive method for detection of hypochlorous acid for the imaging of microbe-induced HOCl production. *Chemical Communications* [online]. **47**(15). ISSN 1359-7345. Dostupné z: doi:10.1039/c1cc10589b
- CHEN, Xiaoqiang, Kyung-Ah LEE, Xintong REN, Jae-Chan RYU, Gyungmi KIM, Ji-Hwan RYU, Won-Jae LEE a Juyoung YOON, 2016. Synthesis of a highly HOCl-selective fluorescent probe and its use for imaging HOCl in cells and organisms. *Nature Protocols* [online]. **11**(7), 1219-1228. ISSN 1754-2189. Dostupné z: doi:10.1038/nprot.2016.062
- CHENG, Guangjie, Zehong CAO, Xiangxi XU, Erwin G. Van MEIR a J. David LAMBETH, 2001. Homologs of gp91 phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Gene* [online]. **269**(1-2), 131-140. ISSN 03781119. Dostupné z: doi:10.1016/S0378-1119(01)00449-8
- CHMIEL, John A., Brendan A. DAISLEY, Jeremy P. BURTON, Gregor REID a Janet K. JANSSON, 2019. Deleterious Effects of Neonicotinoid Pesticides on *Drosophila melanogaster* Immune Pathways. *MBio* [online]. **10**(5), e01395-19. ISSN 2150-7511. Dostupné z: doi:10.1128/mBio.01395-19
- CHO, Youngwoo a Saeyoull CHO, 2019. Hemocyte-hemocyte adhesion by granulocytes is associated with cellular immunity in the cricket, *Gryllus bimaculatus*. *Scientific Reports* [online]. **9**(1). ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-019-54484-5
- IATSENKO, Igor, Jean-Philippe BOQUETE a Bruno LEMAITRE, 2018. Microbiota-Derived Lactate Activates Production of Reactive Oxygen Species by the Intestinal NADPH Oxidase Nox and Shortens *Drosophila* Lifespan. *Immunity* [online]. **49**(5), 929-942.e5. ISSN 10747613. Dostupné z: doi:10.1016/j.immuni.2018.09.017
- JANG, Youngmok C. a Holly Van REMMEN, 2009. The mitochondrial theory of aging: Insight from transgenic and knockout mouse models. *Experimental Gerontology* [online]. **44**(4), 256-260. ISSN 05315565. Dostupné z: doi:10.1016/j.exger.2008.12.006
- JIANG, Huaqi, Parthive H. PATEL, Alexander KOHLMAIER, Marc O. GRENLEY, Donald G. MCEWEN a Bruce A. EDGAR, 2009. Cytokine/Jak/Stat Signaling Mediates Regeneration and Homeostasis in the *Drosophila* Midgut. *Cell* [online]. **137**(7), 1343-1355. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2009.05.014
- JONES, Dean P., 2006. Redefining Oxidative Stress. *Antioxidants & Redox Signaling* [online]. **8**(9-10), 1865-1879. ISSN 1523-0864. Dostupné z: doi:10.1089/ars.2006.8.1865
- JONES, Rheinallt M, Liping LUO, Courtney S ARDITA, et al., 2013. Symbiotic lactobacilli stimulate gut epithelial proliferation via Nox-mediated generation of reactive oxygen species. *The EMBO Journal* [online]. **32**(23), 3017-3028. ISSN 02614189. Dostupné z: doi:10.1038/emboj.2013.224

- KALYANARAMAN, Balaraman, Victor DARLEY-USMAR, Kelvin J.A. DAVIES, et al., 2012. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Radical Biology and Medicine* [online]. **52**(1), 1-6. ISSN 08915849. Dostupné z: doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.030
- KANEKO, Takashi, William E GOLDMAN, Peter MELLROTH, et al., 2004. Monomeric and Polymeric Gram-Negative Peptidoglycan but Not Purified LPS Stimulate the Drosophila IMD Pathway. *Immunity* [online]. **20**(5), 637-649 [cit. 2023-04-27]. ISSN 10747613. Dostupné z: doi:10.1016/S1074-7613(04)00104-9
- KARAKUZU, Ozgur, Melissa CRUZ, Yi LIU a Danielle GARSIN, 2019. Amplex Red Assay for Measuring Hydrogen Peroxide Production from *Caenorhabditis elegans*. *BIO-PROTOCOL* [online]. **9**(21). ISSN 2331-8325. Dostupné z: doi:10.21769/BioProtoc.3409
- KAVANAGH, Kevin a Emer P. REEVES, 2004. Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews* [online]. **28**(1), 101-112. ISSN 1574-6976. Dostupné z: doi:10.1016/j.femsre.2003.09.002
- KAWAHARA, Tsukasa, Mark T QUINN a J David LAMBETH, 2007. Molecular evolution of the reactive oxygen-generating NADPH oxidase (Nox/Duox) family of enzymes. *BMC Evolutionary Biology* [online]. **7**(1). ISSN 1471-2148. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2148-7-109
- KAWAHARA, Tsukasa a J David LAMBETH, 2007. Molecular evolution of Phox-related regulatory subunits for NADPH oxidase enzymes. *BMC Evolutionary Biology* [online]. **7**(1). ISSN 1471-2148. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2148-7-178
- KETTLE, Anthony J., Anitra C. CARR a Christine C. WINTERBOURN, 1994. Assays using horseradish peroxidase and phenolic substrates require superoxide dismutase for accurate determination of hydrogen peroxide production by neutrophils. *Free Radical Biology and Medicine* [online]. **17**(2), 161-164. ISSN 08915849. Dostupné z: doi:10.1016/0891-5849(94)90111-2
- KIM, Sung-Hee a Won-Jae LEE, 2014. Role of DUOX in gut inflammation: lessons from *Drosophila* model of gut-microbiota interactions. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [online]. **3**. ISSN 2235-2988. Dostupné z: doi:10.3389/fcimb.2013.00116
- KOJIĆ, Danijela, Jelena PURAĆ, Tatjana V. ČELIĆ, Danica JOVIĆ, Elvira L. VUKAŠINOVIĆ, Ivan PIHLER, Ivana BORIŠEV a Aleksandar DJORDJEVIC, 2020. Effect of fullerene nanoparticles on oxidative stress induced by paraquat in honey bees. *Environmental Science and Pollution Research* [online]. **27**(6), 6603-6612. ISSN 0944-1344. Dostupné z: doi:10.1007/s11356-019-07385-z
- KRAMER, Boris H., Volker NEHRING, Anja BUTTSTEDT, et al., 2021. Oxidative stress and senescence in social insects: a significant but inconsistent link?. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* [online]. **376**(1823). ISSN 0962-8436. Dostupné z: doi:10.1098/rstb.2019.0732
- KUMAR, Sanjeev, Alvaro MOLINA-CRUZ, Lalita GUPTA, Janneth RODRIGUES a Carolina BARILLAS-MURY, 2010. A Peroxidase/Dual Oxidase System Modulates Midgut Epithelial Immunity in *Anopheles gambiae*. *Science* [online]. **327**(5973), 1644-1648. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.1184008
- KWONG, Waldan K. a Nancy A. MORAN, 2016. Gut microbial communities of social bees. *Nature Reviews Microbiology* [online]. **14**(6), 374-384. ISSN 1740-1526. Dostupné z: doi:10.1038/nrmicro.2016.43
- LALEU, Benoît, Francesca GAGGINI, Mike ORCHARD, et al., 2010. First in Class, Potent, and Orally Bioavailable NADPH Oxidase Isoform 4 (Nox4) Inhibitors for the Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Journal of Medicinal Chemistry* [online]. **53**(21), 7715-7730. ISSN 0022-2623. Dostupné z: doi:10.1021/jm100773e
- LAMBETH, J. David, 2004. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature Reviews Immunology* [online]. **4**(3), 181-189. ISSN 1474-1733. Dostupné z: doi:10.1038/nri1312
- LAMBETH, J. David a Andrew S. NEISH, 2014. Nox Enzymes and New Thinking on Reactive Oxygen: A Double-Edged Sword Revisited. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* [online]. **9**(1), 119-145. ISSN 1553-4006. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-pathol-012513-104651

- LAPOINTE, Jérôme a Siegfried HEKIMI, 2010. When a theory of aging ages badly. *Cellular and Molecular Life Sciences* [online]. **67**(1), 1-8. ISSN 1420-682X. Dostupné z: doi:10.1007/s00018-009-0138-8
- LAVINE, M.D. a M.R. STRAND, 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* [online]. **32**(10), 1295-1309. ISSN 09651748. Dostupné z: doi:10.1016/S0965-1748(02)00092-9
- LEE, Kyung-Ah, Sung-Hee KIM, Eun-Kyoung KIM, et al., 2013. Bacterial-Derived Uracil as a Modulator of Mucosal Immunity and Gut-Microbe Homeostasis in *Drosophila*. *Cell* [online]. **153**(4), 797-811. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2013.04.009.
- LEE, Won-Jae a Paul T. BREY, 2013. How Microbiomes Influence Metazoan Development: Insights from History and *Drosophila* Modeling of Gut-Microbe Interactions. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* [online]. **29**(1), 571-592. ISSN 1081-0706. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-cellbio-101512-122333
- LEE, Kyung-Ah, Boram KIM, Jinhyuk BHIN, et al., 2015. Bacterial Uracil Modulates *Drosophila* DUOX-Dependent Gut Immunity via Hedgehog-Induced Signaling Endosomes. *Cell Host & Microbe* [online]. **17**(2), 191-204. ISSN 19313128. Dostupné z: doi:10.1016/j.chom.2014.12.012
- LEE, Kyung-Ah, Kyu-Chan CHO, Boram KIM, et al., 2018. Inflammation-Modulated Metabolic Reprogramming Is Required for DUOX-Dependent Gut Immunity in *Drosophila*. *Cell Host & Microbe* [online]. **23**(3), 338-352.e5. ISSN 19313128. Dostupné z: doi:10.1016/j.chom.2018.01.011
- LEE, Kyung-Ah a Won-Jae LEE, 2018. Immune–metabolic interactions during systemic and enteric infection in *Drosophila*. *Current Opinion in Insect Science* [online]. **29**, 21-26. ISSN 22145745. Dostupné z: doi:10.1016/j.cois.2018.05.014
- LEUSEN, Jeanette H.W., Kees FLUITER, Petra M. HILARIUS, Dirk ROOS, Arthur J. VERHOEVEN a Ben G.J.M. BOLSCHER, 1995. Interactions between the Cytosolic Components p47 and p67 of the Human Neutrophil NADPH Oxidase That Are Not Required for Activation in the Cell-free System. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **270**(19), 11216-11221. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.270.19.11216
- LEWKOWSKI, Oleg, Anja POEHLEIN, Rolf DANIEL a Silvio ERLER, 2022. In the battle of the disease: a transcriptomic analysis of European foulbrood-diseased larvae of the Western honey bee (*Apis mellifera*). *BMC Genomics* [online]. **23**(1). ISSN 1471-2164. Dostupné z: doi:10.1186/s12864-022-09075-6
- LU, Chensheng, Chi-Hsuan CHANG, Cynthia PALMER, Meirong ZHAO a Quan ZHANG, 2018. Neonicotinoid Residues in Fruits and Vegetables: An Integrated Dietary Exposure Assessment Approach. *Environmental Science & Technology* [online]. **52**(5), 3175-3184. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/acs.est.7b05596
- MARTYN, Kendra D., Linda M. FREDERICK, Katharina VON LOEHNEISEN, Mary C. DINAUER a Ulla G. KNAUS, 2006. Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases. *Cellular Signalling* [online]. **18**(1), 69-82. ISSN 08986568. Dostupné z: doi:10.1016/j.cellsig.2005.03.023
- MISHIN, Vladimir, Diane E. HECK, Debra L. LASKIN a Jeffrey D. LASKIN, 2020. The amplex red/horseradish peroxidase assay requires superoxide dismutase to measure hydrogen peroxide in the presence of NAD(P)H. *Free Radical Research* [online]. **54**(8-9), 620-628. ISSN 1071-5762. Dostupné z: doi:10.1080/10715762.2020.1821883
- MITCHELL, E. A. D., B. MULHAUSER, M. MULOT, A. MUTABAZI, G. GLAUSER a A. AEBI, 2017. A worldwide survey of neonicotinoids in honey. *Science* [online]. **358**(6359), 109-111. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.aan3684
- MONTEZANO, Augusto C., Livia DE LUCCA CAMARGO, Patrik PERSSON, et al., 2018. NADPH Oxidase 5 Is a Pro-Contractile Nox Isoform and a Point of Cross-Talk for Calcium and Redox Signaling-Implications in Vascular Function. *Journal of the American Heart Association* [online]. **7**(12). ISSN 2047-9980. Dostupné z: doi:10.1161/JAHA.118.009388
- MURPHY, Michael P., Hülya BAYIR, Vsevolod BELOUSOV, et al., 2022. Guidelines for measuring reactive oxygen species and oxidative damage in cells and in vivo. *Nature*

- Metabolism* [online]. **4**(6), 651-662. ISSN 2522-5812. Dostupné z: doi:10.1038/s42255-022-00591-z
- NAPPI, Anthony J, Emily VASS, Françoise FREY a Yves CARTON, 2000. Nitric Oxide Involvement in Drosophila Immunity. *Nitric Oxide* [online]. **4**(4), 423-430. ISSN 10898603. Dostupné z: doi:10.1006/niox.2000.0294
- NAUSEEF, William M., 2004. Assembly of the phagocyte NADPH oxidase. *Histochemistry and Cell Biology* [online]. **122**(4), 277-291. ISSN 0948-6143. Dostupné z: doi:10.1007/s00418-004-0679-8
- NAUSEEF, William M., 2014. Detection of superoxide anion and hydrogen peroxide production by cellular NADPH oxidases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* [online]. **1840**(2), 757-767. ISSN 03044165. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbagen.2013.04.040
- NEGRI, Pedro, Silvina QUINTANA, Matias MAGGI, Nicolas SZAWARSKI, Lorenzo LAMATTINA a Martin EGUARAS, 2014. Apis mellifera hemocytes generate increased amounts of nitric oxide in response to wounding/encapsulation. *Apidologie* [online]. **45**(5), 610-617. ISSN 0044-8435. Dostupné z: doi:10.1007/s13592-014-0279-0
- NISIMOTO, Yukio, Becky A. DIEBOLD, Daniela COSENTINO-GOMES a J. David LAMBETH. Nox4: A Hydrogen Peroxide-Generating Oxygen Sensor. *Biochemistry* [online]. 2014, **53**(31), 5111-5120. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:10.1021/bi500331y
- OLGUN, Tuğçe, Miray DAYIOĞLU a Neslihan ÖZSOY TAĞKIRAN, 2020. Pesticide and Pathogen Induced Oxidative Stress in Honey Bees (*Apis Mellifera* L.). *Mellifera* [online]. **20**(2):32-52
- OLIVEIRA, Jose Henrique M., Renata L. S. GONÇALVES, Flavio A. LARA, et al., 2011. Blood Meal-Derived Heme Decreases ROS Levels in the Midgut of *Aedes aegypti* and Allows Proliferation of Intestinal Microbiota. *PLoS Pathogens* [online]. **7**(3). ISSN 1553-7374. Dostupné z: doi:10.1371/journal.ppat.1001320
- OMHOLT, Stig W. a Gro V. AMDAM, 2004. Epigenetic Regulation of Aging in Honeybee Workers. *Science of Aging Knowledge Environment* [online]. **2004**(26). ISSN 1539-6150. Dostupné z: doi:10.1126/sageke.2004.26.pe28
- PAITAL, Biswaranjan, 2014. A Modified Fluorimetric Method for Determination of Hydrogen Peroxide Using Homovanillic Acid Oxidation Principle. *BioMed Research International* [online]. **2014**, 1-8. ISSN 2314-6133. Dostupné z: doi:10.1155/2014/342958
- PANDAY, Arvind, Malaya K SAHOO, Diana OSORIO a Sanjay BATRA, 2015. NADPH oxidases: an overview from structure to innate immunity-associated pathologies. *Cellular & Molecular Immunology* [online]. **12**(1), 5-23. ISSN 1672-7681. Dostupné z: doi:10.1038/cmi.2014.89
- PANDEY, J.P. a R.K. TIWARI, 2012. An Overview of Insect Hemocyte Science and its Future Application in Applied and Biomedical Fields. *American Journal of Biochemistry and Molecular Biology* [online]. **2**(3), 82-105. ISSN 21504210. Dostupné z: doi:10.3923/ajbmb.2012.82.105
- PARIS, Laurianne, Michaël ROUSSEL, Bruno PEREIRA, Frédéric DELBAC a Marie DIOGON, 2017. Disruption of oxidative balance in the gut of the western honeybee *Apis mellifera* exposed to the intracellular parasite *Nosema ceranae* and to the insecticide fipronil. *Microbial Biotechnology* [online]. **10**(6), 1702-1717. ISSN 1751-7915. Dostupné z: doi:10.1111/1751-7915.12772
- PATEL, Parthive H, Julieta A MALDERA a Bruce A EDGAR, 2013. Stimulating cROSstalk between commensal bacteria and intestinal stem cells. *The EMBO Journal* [online]. **32**(23), 3009-3010. ISSN 02614189. Dostupné z: doi:10.1038/emboj.2013.244.
- PHAM, Hunter T., Joy YOO, Michael VANDENBERG a Mark A. MUYSKENS, 2020. Fluorescence of Scopoletin Including its Photoacidity and Large Stokes Shift. *Journal of Fluorescence* [online]. **30**(1), 71-80. ISSN 1053-0509. Dostupné z: doi:10.1007/s10895-019-02471-4
- RADA, Balázs a Thomas L. LETO, 2008. Oxidative Innate Immune Defenses by Nox/Duox Family NADPH Oxidases. EGESTEN, A., A. SCHMIDT a H. HERWALD, ed. *Trends in Innate Immunity* [online]. Basel: KARGER, 2008, s. 164-187. Contributions to Microbiology. ISBN 978-3-8055-8548-4. Dostupné z: doi:10.1159/000136357

- RATIU, Attila C., Alina NEAGU, Mihaela R. MIHALACHE, Veronica LAZAR a Alexandru Al. EVOCOIU, 2016. Molecular and bioinformatics analysis of the relative expression profiles of dorsal, Toll-1, Relish and Duox genes in young versus old diutinus workers of *Apis mellifera*. *Rom Biotech Lett* [online]. **21**(3), 11513-26
- RICHARDSON, Rodney T., Megan N. BALLINGER, Feng QIAN, John W. CHRISTMAN a Reed M. JOHNSON, 2018. Morphological and functional characterization of honey bee, *Apis mellifera*, hemocyte cell communities. *Apidologie* [online]. **49**(3), 397-410. ISSN 0044-8435. Dostupné z: doi:10.1007/s13592-018-0566-2
- RISTOW, Michael a Sebastian SCHMEISSER, 2011. Extending life span by increasing oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine* [online]. **51**(2), 327-336. ISSN 08915849. Dostupné z: doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.010
- RITSICK, Darren R., William A. EDENS, Victoria FINNERTY a J. David LAMBETH, 2007. Nox regulation of smooth muscle contraction. *Free Radical Biology and Medicine* [online]. **43**(1), 31-38. ISSN 08915849. Dostupné z: doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.006
- RUCH, Walter, Philip H. COOPER a Marco BAGGIOLINI, 1983. Assay of H₂O₂ production by macrophages and neutrophils with homovanillic acid and horse-radish peroxidase. *Journal of Immunological Methods* [online]. **63**(3), 347-357. ISSN 00221759. Dostupné z: doi:10.1016/S0022-1759(83)80008-8
- SALEM, Hassan, Eugen BAUER, Anja S. STRAUSS, Heiko VOGEL, Manja MARZ a Martin KALTENPOTH, 2014. Vitamin supplementation by gut symbionts ensures metabolic homeostasis in an insect host. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* [online]. **281**(1796). ISSN 0962-8452. Dostupné z: doi:10.1098/rspb.2014.1838
- SAMMATARO, Diana, Lilia DE GUZMAN, Sherly GEORGE, Ron OCHOA a Gard OTIS, 2015. Standard methods for tracheal mite research. *Journal of Apicultural Research* [online]. **52**(4), 1-20. ISSN 0021-8839. Dostupné z: doi:10.3896/IBRA.1.52.4.20
- SCHMIT, A.R. a N.A. RATCLIFFE, 1978. The encapsulation of Araldite implants and recognition of foreignness in *Clitumnus extradentatus*. *Journal of Insect Physiology* [online]. **24**(6-7), 511-521. ISSN 00221910. Dostupné z: doi:10.1016/0022-1910(78)90052-5
- SŁOWIŃSKA, Mariola, Joanna NYNCA, Jerzy WILDE, Beata BAŁ, Maciej SIUDA a Andrzej CIERESZKO, 2016. Total antioxidant capacity of honeybee haemolymph in relation to age and exposure to pesticide, and comparison to antioxidant capacity of seminal plasma. *Apidologie* [online]. **47**(2), 227-236. ISSN 0044-8435. Dostupné z: doi:10.1007/s13592-015-0391-9
- STRAND, Michael R., 2008. The insect cellular immune response. *Insect Science* [online]. **15**(1), 1-14. ISSN 16729609. Dostupné z: doi:10.1111/j.1744-7917.2008.00183.x
- TOJO, Sumio, Fumihiko NAGANUMA, Kenryo ARAKAWA a Shinya YOKOO, 2000. Involvement of both granular cells and plasmatocytes in phagocytic reactions in the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *Journal of Insect Physiology* [online]. **46**(7), 1129-1135. ISSN 00221910. Dostupné z: doi:10.1016/S0022-1910(99)00223-1
- VOTYAKOVA, Tatyana V. a Ian J. REYNOLDS, 2004. Detection of hydrogen peroxide with Amplex Red: interference by NADH and reduced glutathione auto-oxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* [online]. **431**(1), 138-144. ISSN 00039861. Dostupné z: doi:10.1016/j.abb.2004.07.025
- WEINSTOCK, George M. (The Honeybee Genome Sequencing Consortium) Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*, 2006. *Nature* [online]. **443**(7114), 931-949. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/nature05260
- WILLIAMS, June H., Zandri WHITEHEAD a Erna VAN WILPE, 2016. Paraquat intoxication and associated pathological findings in three dogs in South Africa. *Journal of the South African Veterinary Association* [online]. **87**(1). ISSN 2224-9435. Dostupné z: doi:10.4102/jsava.v87i1.1352
- WU, Shih-Cheng, Chih-Wei LIAO, Rong-Long PAN a Jyh-Lyh JUANG, 2012. Infection-Induced Intestinal Oxidative Stress Triggers Organ-to-Organ Immunological Communication in *Drosophila*. *Cell Host & Microbe* [online]. **11**(4), 410-417. ISSN 19313128. Dostupné z: doi:10.1016/j.chom.2012.03.004

- ZHANG, Lei, Yan-wen WANG a Zhi-qiang LU, 2015. Midgut immune responses induced by bacterial infection in the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B* [online]. **16**(10), 875-882. ISSN 1673-1581. Dostupné z: doi:10.1631/jzus.B1500060
- ZHAO, Baozhong, Fiona A. SUMMERS a Ronald P. MASON, 2012. Photooxidation of Amplex red to resorufin: Implications of exposing the Amplex red assay to light. *Free Radical Biology and Medicine* [online]. **53**(5), 1080-1087. ISSN 08915849. Dostupné z: doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.06.034
- ZHOU, Mingjie, Zhenjun DIWU, Nataliya PANCHUK-VOLOSHINA a Richard P. HAUGLAND, 1997. A Stable Nonfluorescent Derivative of Resorufin for the Fluorometric Determination of Trace Hydrogen Peroxide: Applications in Detecting the Activity of Phagocyte NADPH Oxidase and Other Oxidases. *Analytical Biochemistry* [online]. **253**(2), 162-168. ISSN 00032697. Dostupné z: doi:10.1006/abio.1997.2391
- ZOR, Tsaffrir a Zvi SELINGER, 1996. Linearization of the Bradford Protein Assay Increases Its Sensitivity: Theoretical and Experimental Studies. *Analytical Biochemistry* [online]. **236**(2), 302-308. ISSN 00032697. Dostupné z: doi:10.1006/abio.1996.0171

8 Seznam použitých zkratek

AMP	antimikrobiální peptidy
AR	AmplexRed
ATF	aktivační transkripční faktor
BSA	hovězí sérový albumin
Cad	Cadherin
CAT	katalasa
DHE	dihydroethidium
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DPI	difenylenjodonium
Duox	duální oxidasa
<i>Ecc</i>	<i>Erwinia carotovora carotovora</i>
ER	endoplasmatické retikulum
FAD	flavinadenindinukleotid
G+/-	Gram-pozitivní/negativní
GPX	glutathion peroxidasa
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HRP	křenová peroxidasa
HVA	homovanilová kyselina
IMD	„immune defficiency“ dráha
ISC	kmenové buňky trávicího traktu
JAK/STAT	Janus kinasa/“signal transducer and activator of transcription“
JNK	Jun N-terminální kinasy
LDH	laktátdehydrogenasa
LPS	lipopolysacharidy
MPO	myeloperoxidasa
NAD(P)H	nikotinamidadenindinukleotid(fosfát)
NOS	NO-syntasa
Nox	NADPH-oxidasa
Noxa	Nox aktivátor
Noxo	Nox organizátor
PAMP	molekulární vzorec asociovaný s patogeny

PBS	roztok pufovaný fosfátem
PG	peptidoglykan
PGRP	receptorový protein rozpoznávající peptidoglykan
PKC	proteinkinasa C
PLC	fosfolipasa C
PMA	forbol 12-myristát 13-acetát
POX	peroxidasa
PQ	paraquat
Prx	peroxiredoxin
RCF	relativní centrifugační síla
RFU	relativní fluorescenční jednotka
RNAi	interference ribonukleové kyseliny
ROS	reaktivní formy kyslíku
SOD	superoxiddismutasa
TR	thioredoxinreduktasa
TRAF	faktor asociovaný s receptorem pro tumor nekrotizujícím faktor
UV	ultrafialové světlo
XDH	xanthindehydrogenasa