

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

**Biochemické a fyziologické
obránné reakce včely medonosné ve
stresových situacích**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Bc. Nela Prokúpková

ŠKOLITEL: prof. RNDr. Dalibor Kodrík, CSc.

České Budějovice, 2024

Prokúpková, N., 2024: Biochemické a fyziologické obranné reakce včely medonosné ve stresových situacích. [Biochemical and physiological defense reactions of the honeybee *Apis mellifera* L. in stressful situations. Mgr. thesis, in Czech] – 47. p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

ANNOTATION

This master thesis aimed to investigate the effects of honeybee venom and venom of the parasitoid wasp *Habrobracon hebetor* on the physiological characteristics of the honeybees *Apis mellifera*. The study compared the effects of the two venoms on various parameters. These involved measuring the levels of nutrients (carbohydrates, lipids) in hemolymph, the level and expression of adipokinetic hormone in the central nervous system, oxidative stress (in the gut, fat body), and the composition of honeybee venom of the worker honeybees *A. mellifera*. Furthermore, muscle structure was examined using transmission electron microscopy (TEM). The venoms were injected into the honeybee's body and the characteristics mentioned above were measured 24 hours after venom application. The results showed that the effects of *H. hebetor* venom on the nutrient levels in hemolymph varied – the levels of carbohydrates and lipids decreased and increased depending on the dose applied. The levels and expression of adipokinetic hormone in the central nervous system were reduced in both cases. Both venoms affected the composition of the venom but in different ways. The activity of oxidative stress enzymes was also affected by both venoms, where significant differences could be observed. The *H. hebetor* venom caused damage to the myofibril structure, while bee venom appeared to have no major effect on myofibrils.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích, dne 11.4. 2024

.....
Bc. Nela Prokúpková

PODĚKOVÁNÍ

Velmi ráda bych zde poděkovala všem, kteří mi s dokončením této magisterské práce pomáhali a poskytovali mi oporu v lehkých i nelehkých chvílích. V první řadě bych chtěla poděkovat svému školiteli, panu prof. RNDr. Daliboru Kodríkovi, CSc. za příležitost práci vypracovat pod jeho vedením, za čas, který mi věnoval a za ochotu, se kterou mi vždy radil. Dále bych chtěla poděkovat celému týmu laboratoře Fyziologie hmyzu ENTÚ za vytvoření vřelého a přátelského pracovního prostředí. Konkrétně bych pak chtěla poděkovat paní Ing. Heleně Štěrbové a panu RNDr. Janu Černému za nejedno společné pracovní odpoledne strávené v laboratoři s hrnkem kávy. Moje díky patří také paní Mgr. Markétě Hejníkové, PhD. za pomoc s molekulárními metodami a za trpělivé zodpovídání mých nekonečných dotazů. Moje největší poděkování ale patří mé rodině, které mě neustále podporuje a tlačí kupředu, nejen ve studijním, ale i v osobním životě.

OBSAH

1	ÚVOD	1
1.1	BIOLOGICKÝ STRES	1
1.2	STRESORY	2
1.2.1	Živočišné jedy jako stresory	3
1.2.1.1	Jed včely medonosné (<i>Apis mellifera</i>)	4
1.2.1.2	Jed lumčíka skladištního (<i>Habrobracon hebetor</i>)	5
1.3	ANTISTRESOVÉ REAKCE	6
1.3.1	Adipokinetické hormony (AKH)	6
1.3.2	Biogenní aminy	8
2	CÍLE PRÁCE	9
3	MATERIÁLY A METODIKA	10
3.1	VČELA MEDONOSNÁ JAKO MODELOVÝ ORGANISMUS	10
3.2	CHOV LUMČÍKA SKLADIŠTNÍHO	10
3.3	ZÍSKÁNÍ A APLIKACE JEDU VČELY MEDONOSNÉ A LUMČÍKA SKLADIŠTNÍHO	10
3.4	STANOVENÍ MNOŽSTVÍ ŽIVIN	10
3.4.1	Glycidy	10
3.4.2	Lipidy	11
3.5	IMUNOLOGICKÉ STANOVENÍ HLADINY AKH V CNS A TOXINŮ VE VČELÍM JEDU	12
3.5.1	Stanovení hladiny AKH v CNS	12
3.5.2	Stanovení hladiny vitellogeninu v jedové žláze	13
3.5.3	Stanovení hladiny melittinu v jedovém váčku	13
3.6	RELATIVNÍ EXPRESE AKH V CNS	14
3.6.1	Izolace RNA	14
3.6.2	Reverzní transkripce	14
3.6.3	q-RT-PCR	14
3.7	STANOVENÍ HLADINY OXIDATIVNÍHO STRESU	15
3.7.1	Enzymatická aktivita katalázy (CAT)	15
3.7.2	Enzymatická aktivita superoxid dismutázy (SOD)	16
3.7.3	Enzymatická aktivita glutathion-S-transferázy (GST)	17
3.7.4	Celková antioxidantní aktivita (TAA)	18

3.8	TRANSMISNÍ ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE (TEM).....	19
3.9	STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ.....	19
4	VÝSLEDKY	20
4.1	ÚČINKY JEDU LUMČÍKA SKLADIŠTNÍHO (<i>H. HEBETOR</i>).....	20
4.2	VLIV JEDU LUMČÍKA SKLADIŠTNÍHO NA HLADINU ŽIVIN V HEMOLYMFĚ.....	20
4.3	VLIV APLIKOVANÝCH JEDŮ NA HLADINU A EXPRESI AKH V CNS	22
4.4	VLIV APLIKOVANÝCH JEDŮ NA SLOŽENÍ TOXINŮ V JEDOVÉM VÁČKU	23
4.5	OXIDATIVNÍ STRES.....	25
4.6	TRANSMISNÍ ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE.....	28
5	DISKUZE	29
6	ZÁVĚR	33
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	34

1 ÚVOD

Definovat pojem stres není jednoduché, jelikož se jeho definice mění s úhlem pohledu, pod kterým na něj nahlížíme. Obecně můžeme říci, že stres lze chápat jako celkovou reakci organismu na jakoukoli změnu (tzv. stresor), která může organismus ohrozit, a proto vyžaduje jeho přizpůsobení či odpověď. Tělo organismu reaguje na tyto změny pomocí fyziologických, imunitních, behaviorálních nebo emocionálních antistresových reakcí a snaží se působení stresoru co nejrychleji zastavit nebo ho alespoň omezit. Stres je tedy univerzální reakce, bez které organismus nemůže přežít (Cohen a kol., 2016). Přírodní toxiny jsou významnými stresory narušující homeostázu a způsobující tak biologický stres v těle organismu. Jejich výzkum je zásadní pro pochopení jejich účinků na lidský organismus a také z hlediska potenciálního využití jejich jednotlivých složek v oblasti vývoje léčiv.

1.1 BIOLOGICKÝ STRES

Jako první definoval stres v roce 1936 kanadský endokrinolog maďarského původu Hans Selye a to jako nespecifickou reakci těla na jakýkoliv nežádoucí podnět (Fink, 2009). Důležité je, všimnout si zde pojmu „nespecifickou“. Hans Selye totiž předpokládal, že jakákoliv změna prostředí vyvolá v organismu stejnou antistresovou reakci, bez ohledu na to, jaký stresor tuto reakci způsobí. Tuto odpověď organismu na stres proto nazval jako „Obecný adaptační syndrom“ (GAS – general adaptive syndrome). Ten rozdělil do tří fází – na fázi poplachovou, adaptační a na fázi vyčerpání. V poplachové fázi dochází k okamžité odpovědi nazývané „fight or flight“. Následuje adaptační fáze, kdy se organismus snaží minimalizovat dopady stresoru a jeho působení kompenzovat. Pokud působení stresoru přetrvává přichází fáze vyčerpání, kdy dochází k selhání adaptačních mechanismů a organismus již není schopen udržet optimální fyziologické funkce. V extrémních případech pak může dojít i ke jeho smrti. Hans Selye vedle termínu samotného stresu zavedl také pojmy eustres a distres. Eustresem označil pozitivní zátěž stimulující jedince k lepším a vyšším výkonům. Naopak distresem rozumíme nadměrnou zátěž, která jedince poškozuje.

Biologický koncept stresu byl poprvé zkoumán u savců. Jak je výše uvedeno, reakce na stres byla popsána jako „Obecný adaptační syndrom“, který představuje soubor antistresových fyziologických reakcí na různorodé škodlivé podněty. Fyziologické mechanismy stresu u

savců byly pak podrobně zkoumány prostřednictvím různých behaviorálních a fyziologických studií. Jedním z hlavních prvků antistresové reakční dráhy savců je endokrinní a nervová soustava, konkrétně se jedná o sympato-adreno-medulární osu (SAM) a hypothalamo-hypofyzárně-adrenální osu (HPA).

V posledních letech jsou antistresové fyziologické reakce studovány také u hmyzu. Studie se zabývají především biogenními aminy jako jsou oktopamin, dopamin a histamin, dále neuropeptidy jako allatostatin a korazonin a metabolickými hormony, z nichž je nejvýznamnější adipokinetický hormon (Even et al., 2012). Výzkum fyziologických reakcí hmyzu vyvolaných stresory je klíčový hned z několika důvodů. Zejména proto, že tyto reakce nápadně odrážejí reakce pozorované u savců, včetně člověka. Tato skutečnost tak umožňuje vědcům využívat hmyz jako modelový organismu a poskytuje tak možnost zkoumání základních fyziologických procesů v těle a potenciál pro využití získaných informací napříč různými živočišnými druhy (Kumar a Flatt, 2013). Hmyz se svými přístupnějšími fyziologickými systémy poskytuje jedinečnou možnost detailně zkoumat mechanismy antistresových reakcí, což je u vyšších organismů náročnější. Výzkumy se zvláště zaměřují na neuroendokrinní reakce, změny v chování, změny metabolismu a imunitního systému jako na ukazatele stresu (Adamo, 2014). Toto studium antistresových reakcí je klíčové pro pochopení účinků stresu na organismu od změn způsobených na molekulární úrovni až po změny týkající se chování organismu. Kromě toho má pochopení antistresových reakcí hmyzu i praktický význam pro ekologii, zemědělství a další oblasti.

1.2 STRESORY

Jak již bylo výše zmíněno, stresor představuje jakýkoliv faktor nebo podnět ohrožující homeostázu organismu. Stresory lze rozlišovat na externí (vlivy vnějšího prostředí) nebo interní (onemocnění, zranění). Mezi stresory patří fyzikální podněty (teplota, záření, hluk, vibrace atd.), chemické podněty (léky, pesticidy, kovy, smog, abnormální koncentrace kyslíku atd.) a fyziologické podněty (nemoci, zranění, stárnutí, záněty atd.), jež narušují funkční homeostázu organismu a vyvolávají antistresovou reakci (Kodrík a kol., 2015).

1.2.1 Živočišné jedy jako stresory

Jedovatá zvířata jsou pro člověka již po mnoho let předmětem zájmu, a to nejen kvůli nebezpečí, které představují, ale i kvůli možnosti využití účinků jejich jedy v oblasti medicíny. Zvláštní zájem je především spojen s biologickou aktivitou proteinů izolovaných z jedy včel (melittin, apamina a tertiapin) a sršňů (mastoparan a bradykinin) (Moreno, 2015).

Zvířecí jedy představují biologické stresory, které mohou ovlivnit fyziologii a chování zasažených organismů. Tyto přírodní toxiny, sloužící jako obranné nebo útočné mechanismy, se skládají z různých bioaktivních složek (proteinů (enzymů), peptidů, aminů a dalších), které mohou narušit homeostázu organismu a vyvolat antistresovou reakci. V angličtině jsou rozlišovány termíny „poison“ a „venom“. Rozdíl mezi nimi spočívá v tom, jakým způsobem se jedy dostávají do kontaktu s obětí. „Poisons“ jsou vytvářeny speciálními buňkami nebo tkáněmi, případně získávány z potravy, a jsou toxické při požití nebo dotyku s jedovatým tvorem. „Venoms“ jsou produkovány tkáněmi nebo orgány (jedové žlázy) a jsou do kořisti vstříkovány prostřednictvím specializovaných aparátů jako jsou například zuby nebo žihadla (Fox a Serrano, 2007).

Výzkum týkající se živočišných jedů je důležitý z hlediska jejich komplexního složení a potenciálnímu využití v oblasti biomedicínského výzkumu a vývoje nových léčiv. Studium jedů odhaluje rovnováhu mezi způsobením okamžitého fyziologického stresu a dlouhotrvající obranou antistresovou reakcí. Jinak řečeno, nabízí pohled na evoluční „závody“ mezi jedovatými druhy a jejich kořistí nebo predátory. Porozumění těmto přírodním stresorům také otevírá možnosti novým biomedicínským výzkumům, kde by poznání jednotlivých složek živočišných jedů mohlo rozšířit využití těchto látek pro terapeutické účely, zejména při léčbě bolesti nebo v oblasti imunologie (Fry a kol., 2009). Tato myšlenka není žádnou novinkou, jelikož některé složky jedů jsou již dnes využívány při vývoji nových léčiv užívaných například při léčbě hypertenze, chronické bolesti a onemocnění srdce (Kini, 2017; Casewell a kol, 2013). Na jedy lze tak pohlížet dvěma úhly pohledu. A to jako na látky, které biologický stres vyvolávají nebo naopak jako na látky, které biologický stres dokáží v nízkých koncentracích účinně potlačovat.

1.2.1.1 Jed včely medonosné (*Apis mellifera*)

Včely, stejně jako další *Hymenoptera*, mají žihadlový mechanismus obsahující jed, který je používán jako účinná útočná a/nebo obranná chemická zbraň (Weyda a Kodrík, 2020). Mezi aktivní složky přítomné ve včelím jedu, odpovídající za jeho toxické účinky, patří peptidy (melittin, apamin, tertiapin, denaturační peptid žírných buněk), enzymy (fosfolipáza A2, hyaluronidáza), a další aminokyseliny. Kromě toho včelí jed obsahuje i nízkomolekulární organické látky, a to konkrétně histamin, dopamin a noradrenalin (Banks, 1986). Toxiny včelího jedu vyvolávají v těle oběti řadu fyziologických a biochemických reakcí. Tyto reakce často probíhají v kaskádách nebo pozitivních zpětnovazebních smyčkách, zvyšují celkový účinek jedu a vykazují klasické příznaky v místě vpichu, konkrétně bolest, otok, zarudnutí, svědění nebo jiné fyziologické reakce v celém těle (Fletcher a Jiang, 1993; Calixto a kol., 2003).

Melittin, polypeptid skládající se z 26 aminokyselin, je hlavní složkou včelího jedu a představuje přibližně 50 % jeho sušiny. Tento peptid je syntetizován ve včelí jedové žláze ve formě inaktivovaného prekurzoru nazývaného „prepromelittin“, který se skládá ze 70 aminokyselin (Habermann, 1972). K syntéze samotného melittinu dochází během několikastupňového procesu, který dává vzniknout peptidu s hydrofobním N-koncem a hydrofilním C-koncem. Toxicita melittinu spočívá v jeho schopnosti vázat se na fosfolipidovou dvojvrstvu buněk a vytvářet v ní póry. Další funkcí melittinu je aktivace ostatních enzymů přítomných ve včelím jedu, například fosfolipázy A2, která štěpí další fosfolipidy a napomáhá tak k destrukci buněk (Lubawy a kol., 2019). Působení melittinu v místě bodnutí iniciuje zánětlivou reakci a signalizuje tělu, aby uvolnilo histamin a další zánětlivé mediátory z žírných buněk. Uvolňování histaminu má za následek vazodilataci a zvýšenou propustnost krevních cév, což vede k zarudnutí, otoku a horkosti, kterou lze po včelím bodnutí často pozorovat. Intenzivní bolest spojená s bodnutím je částečně způsobena schopností melittinu přímo aktivovat receptory bolesti, jež vysílají signály bolesti do mozku (Palm, 1993). Kromě své cytolytické aktivity se ukázalo, že melittin má v nízkých koncentracích protizánětlivé a antimikrobiální účinky a nabízí potenciální terapeutické možnosti při léčbě stavů, jako jsou revmatoidní artritida a různé bakteriální infekce (Dempsey, 1990; Kwon a kol., 2002; Son a kol., 2007). Dále se také ukazuje, že by melittin a jeho analogy mohly hrát zásadní roli v léčbě rakoviny. Výzkumy se konkrétně zaměřují na vliv melittinu

na regulaci buněčné apoptózy a faktory, jež způsobují apoptózu u různých typů rakoviny, včetně rakoviny prsu, vaječníků, prostaty a plic (Pandey a kol, 2023).

Jak již bylo výše zmíněno, včelí jed obsahuje i malé množství vitellogeninu. Vitellogenin je glykoprotein hrající klíčovou roli v reprodukci vejcorodých živočichů, konkrétně slouží jako primární prekurzor žloutku. Tento protein, který se vyskytuje ve velké míře u ryb, obojživelníků, plazů, ptáků a hmyzu, je u vyšších živočichů syntetizován primárně v játrech dospělých samic v reakci na stimulaci estrogenu. Následně je vylučován do krevního řečiště a transportován do vaječníků, kde je přijímán vyvíjejícími se oocyty. V oocytech se vitellogenin zpracovává na proteiny žloutku, které poskytují základní živiny pro vyvíjející se embryo. Výzkumy však ukázaly, funkce vitellogeninu v těle živočichů nesouvisí pouze s reprodukcí (Amdam a kol., 2005; Seehuus a kol., 2006). U včel medonosných (*A. mellifera*) má vitellogenin několik zásadních funkcí, jež přesahují jeho primární funkci jako prekurzorový protein žloutku. Vitellogenin je u včel syntetizován v tukovém těle a ovlivňuje délku života včel, odolnost vůči stresu a také jejich sociální roli v úlu. Jeho antioxidační vlastnosti pomáhají snižovat oxidativní stres, čímž prodlužují životnost včelích dělnic a potenciálně zlepšují celkové zdraví včelstva (Amdam a kol., 2005; Seehuus a kol., 2006). Funkce vitellogeninu ve včelím jedu není přesně objasněna. Nicméně, některé studie naznačují, že by vitellogenin ve včelím jedu mohl hrát roli ve spuštění a stimulaci alergické reakce oběti po včelím bodnutí (Blank a kol., 2013).

1.2.1.2 Jed lumčika skladištního (*Habrobracon hebetor*)

H. hebetor neboli lumčík skladištní (*Hymenoptera: Braconidae*), je malá ektoparasitoidní vosička, jež jako hostitele využívá primárně larvy živočichů z řádu *Lepidoptera*. Tento druh parazituje nejčastěji na motýlích druzích *Ephestia kuehniella*, *Plodia interpunctella*, *Ectomyelois ceratoniae* a *Galleria mellonella*. Larvy jsou úplně a nevratně paralyzovány a následně slouží jako „živoucí konzerva“ pro larvy vosičky, které se po vylíhnutí z vajíček dále vyvíjí na hostitelské kutikule (Borzoui et al., 2016). Studium vosičky *H. hebetor* není zajímavé jen z hlediska složení a účinků jejího jedu, ale i z hlediska jejího dalšího využití v oblasti alternativních přístupů k zemědělství (Ueno a Ueno, 2007).

Jed vosičky *H. hebetor* je předmětem mnoha výzkumů. Tento jed, jež tvoří pouze samičky, dokáže velice účinně kompletně paralyzovat svého hostitele. Paralyza je zapříčiněna blokací

receptorů na presynaptické membráně nervosvalového spojení, konkrétně se nejspíše jedná o inhibici glutamátové signální dráhy (Pennacchio a Strand, 2006). Bylo zjištěno, že dalším účinkem tohoto jedu je potlačení buněčné a humorální imunity organismu (Pennacchio a kol., 2014). V posledních letech byl analyzován transkriptom samičích jedových žláz a byly identifikovány kódující oblasti proteinů pro kalretikulin, venom acid phosphatase Acph-1-like protein a argininkinázu (Manzoor a kol., 2016). Podobně byl transkriptom jedové žlázy analyzován i bioinformaticky. Zde došlo k odhalení řady bioaktivních genů, jež také souvisí s potlačením imunity (Hussain a kol, 2019). Úplné složení jedu a jeho funkční mechanismy však stále nejsou zcela známy.

1.3 ANTISTRESOVÉ REAKCE

Je-li organismus vystaven působení nějakého stresoru, jeho odpovědí na tento stresor je tzv. antistresová reakce. Tato reakce může probíhat na různých úrovních: na molekulární, buněčné, fyziologické, ekologické nebo sociální. Antistresové reakce aktivují katabolické procesy v těle a zároveň tlumí procesy, které nejsou okamžitě spojeny s přežitím. Jsou to vysoce konzervativní reakce, které probíhají u většiny taxonů obratlovců včetně lidí jednotně (Möstl a Palme, 2002).

U savců jsou antistresové reakce kontrolovány dvěma hlavními stresovými osami, sympato-adreno-medulární osou (SAM) a hypotalamo-hypofýzou-adrenální osou (HPA). U hmyzu je tomu velmi podobně. Pokud je organismus vystaven vlivu stresoru, z centrálního nervového systému se uvolňují látky jako jsou oktopamin a dopamin. Tyto látky jsou strukturálně příbuzné adrenalinu a noradrenalinu, které můžeme najít právě u savců a hrají u nich podobné fyziologické role. K uvolňování těchto látek dochází velmi rychle po začátku působení stresoru. Následně jsou z centrální nervové soustavy uvolňovány adipokinetické hormony (AKH) z endokrinních žláz *corpora cardiaca*.

1.3.1 Adipokinetické hormony (AKH)

Intenzivní výzkum endokrinních a nervových systémů hmyzu v posledních několika desetiletích odhalil struktury stovek neuropeptidů, které řídí prakticky všechny aspekty života hmyzu. Metabolismus a zejména uvolňování energie je jsou řízeny adipokinetickými hormony

(AKHs), které jsou syntetizovány, skladovány a uvolňovány neurosekrečními buňkami z *corpora cardiaca* (CC), neuroendokrinní žlázy spojené s mozkem.

Adipokinetické hormony (AKH) řadíme mezi hormony s pleiotropním účinkem. Tyto hormony ovlivňují v těle hmyzu různé fyziologické procesy jako metabolismus, rozmnožování, příjem potravy a trávení, srdeční činnost a imunitní reakce (Kodrík, 2008). Dnes je známo již asi 100 forem těchto hormonů vyskytujících se u všech významných řádů hmyzu. Rozdíl v jednotlivých formách spočívá ve složení a umístění aminokyselin v jejich struktuře. U některých druhů hmyzu se vyskytují dva nebo dokonce tři AKH, proč tomu tak je, není ale uspokojivě vysvětleno. Adipokinetické hormony patří do rodiny peptidů AKH/RPCH (rodina adipokinetických hormonů/hormonů koncentrujících červený pigment) a skládají z 8 až 10 aminokyselin. Pro úplnost zde uvádím jedinou výjimku, jež představuje AKH *Vanessa cardui*, který obsahuje 11 aminokyselin (Kollisch a kol., 2000).

Obecně platí, že hlavní role adipokinetických hormonů spočívá v řízení energetického metabolismu hmyzu. Jak je již výše zmíněno, AKH jsou ve svých funkcích pleiotropní a kromě metabolické úlohy plní i mnoho dalších rolí. Obecně platí, že AKH působí jako typické antistresové hormony. AKH mobilizují energetické zásoby lipidů, sacharidů a aminokyselin tím, že stimulují katabolické reakce k získání energie. Současně AKH inhibují syntetické reakce, mobilizovaná energie je tak využívána k eliminaci hrozících stresových situací a není plýtvána reakcemi, které v takových situacích nejsou důležité. Po těchto základních antistresových reakcích následuje stimulace další fyziologických antistresových reakcí, které zahrnují stimulaci srdečního tepu a celkové lokomoce, zesílení imunitních odpovědi, aktivaci antioxidantních mechanismů, zvýšení příjmu potravy a posílení trávení (Kodrík a kol., 2015; Vinokurov a kol., 2014).

U včely medonosné (*A. mellifera*) můžeme najít pouze jedinou formu adipokinetického hormonu. Hormon, který je složen z devíti aminokyselin v podobě – pGlu-Leu-Thr-Phe- Thr-Ser-Ser-Trp-Gly-NH₂ je označován jako Schgr-AKH-II (poprvé objeven u *Schistocerca gregaria* (Gäde a kol., 1986; Marchal a kol., 2018).

1.3.2 Biogenní aminy

Biogenní aminy, jako například oktopamin nebo dopamin, jsou důležitou součástí antistresových reakcí hmyzu. Tyto látky fungují analogickým způsobem jako savčí adrenalin a noradrenalin. V nervovém systému hmyzu jsou uvolňovány do hemolymfy jako přímá odpověď na působící stresory a jsou kritickou součástí pro vytváření behaviorálních a fyziologických antistresových reakcí vedoucích k co nejrychlejšímu obnovení homeostázi (Gruntenko a kol., 2016). Oktopamin působí jako primární stresový signál, zvyšuje srdeční frekvenci hmyzu a připravuje ho na rychlý pohyb, podobně jako je tomu u savčího adrenalinu (Roeder, 1999). Dopamin hraje klíčovou roli ve vytváření stresem ovlivněného chování jako je hledání potravy nebo vyhýbaní se predátorům (Mustard a kol., 2005). Ukazuje se, že biogenní aminy nejsou pro hmyz důležité jen z hlediska okamžité antistresové reakce, ale také pro adaptaci hmyzu na chronický stres, jež může ovlivnit jejich chování i z dlouhodobějšího hlediska (Long a Murdock, 2020).

2 CÍLE PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo sledovat biochemické a fyziologické obranné reakce v těle včely medonosné (*A. mellifera*) po aplikaci vlastního jedu a jedu lumčíka skladištního (*H. hebetor*). Jelikož mají jedy zcela odlišný mechanismus účinku, předpokládalo se, že jejich aplikace bude mít na organismus včely rozdílný vliv. Práce zahrnovala ověření hypotézy o předpokládaných změnách v:

1. Množství živin (glycidy, lipidy) v hemolymfě po aplikaci jedu z lumčíka skladištního
2. Hladině a expresi AKH (adipokinetický hormon) v CNS
3. Hladině markerů oxidativního stresu (kataláza, superoxid dismutáza, glutathion-S-transferáza, TAA)
4. Složení včelího jedu (hladina melittinu, hladina vitellogeninu)

Práce byla doplněna analýzou mikrostrukturálních změn ve svalových buňkách pomocí transmisní elektronové mikroskopie.

3 MATERIÁLY A METODIKA

3.1 Včela medonosná jako modelový organismus

V této práci byly jako modelový organismus použity včely (*A. mellifera*) ze včelnice Biologického centra AVČR v Českých Budějovicích. Konkrétně se jednalo o dělnice neurčitého stáří, generace zimních včel.

3.2 Chov lumčíka skladištního

Lumčici skladištní (*H. hebetor*) byly chovány v termostatu při 25 °C s fotoperiodou 18/6 (dlouhý den). Jako hostitel byly užívány housenky *Ephestia kuehniella*.

3.3 Získání a aplikace jedu včely medonosné a lumčíka skladištního

Včelí jed byl získán darem v rámci spolupráce s Katedrou biochemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Jed lumčíka skladištního byl získán z jedových váčků, které vypitvány přímo do Ringerova fyziologického roztoku. Jedy byly uchovávány v -80 °C.

Jedy byly aplikovány injekčně in vivo přímo do těla pokusných včel v dávkách odpovídajících 7,1 µg melittinu u včelího jedu a 0,1 µg proteinů u jedu lumčíka skladištního. Jed byl ředěn Ringerovým roztokem na objem 2 µl. Doba působení jedů byla 24 hodin. Kontrolní skupiny tvořily včely ošetřené 2 µl Ringerova roztoku.

3.4 Stanovení množství živin

Množství živin (glycidy, lipidy) bylo měřeno v hemolymfě, jež byla odebrána 24 hodin po aplikaci jedu lumčíka skladištního. Hemolymfa byla uchovávána v -80 °C.

3.4.1 Glycidy

Množství glycidů v hemolymfě bylo stanoveno pomocí testu pro stanovení glycidů dle práce Carol a kol. (1956).

Reagencie:

- Anthron (Sigma Aldrich)
- 70% H₂SO₄

Postup:

Nejprve bylo 0,5 µl hemolymfy naředěno ve 400 µl H₂O. Z tohoto roztoku bylo odebráno 40 µl (tedy ekvivalent 0,05 µl hemolymfy) a smícháno s 230 µl anthronové reagens (pozn. 150 mg anthronu ve 100 ml 70% H₂SO₄). Jako blank bylo použito 40 µl vody a 230 µl anthronové reagens. Vzorky byly inkubovány 8 minut při 100 °C. Následně bylo přeneseno 200 µl každého vzorku do jamek mikroděstičky. Pomocí ELISA readeru (Molecular Devices) byla měřena absorbance při vlnové délce 620 nm. Výsledky byly vyhodnoceny podle kalibrační křivky glukózy pohybující se v rozmezí 0,45–14,4 µg glukózy.

3.4.2 Lipidy

Množství lipidů v hemolymfě bylo staveno pomocí testu pro stanovení lipidů dle práce Kodrík a kol. (2000).

Reagencie:

- 96% H₂SO₄
- Vanilín (Sigma Aldrich)
- H₃PO₄

Postup:

Do 100 µl 96% H₂SO₄ byl přidán 1 µl hemolymfy. Jako blank bylo použito 100 µl 96% H₂SO₄. Vzorky byly následně inkubovány 10 minut při 100 °C. Po vychladnutí byl ke vzorkům přidán 1 ml fosfovanilínové reagens (1,98 g vanilínu na 668 ml H₃PO₄), vzorky byly prudce promíchány, nechány 30 minut při pokojové teplotě a poté bylo 200 µl vzorku nanášeno do jamek mikroděstičky. Následně byla měřena absorbance pomocí ELISA readeru (Molecular Devices) při vlnové délce 546 nm. Pro vyhodnocení výsledků byla použita kalibrační křivka kyseliny olejové v rozmezí 1,412- 56,5 µg kyseliny olejové.

3.5 Imunologické stanovení hladiny AKH v CNS a toxinů ve včelím jedu

K získání adipokinetického hormonu (Schgr-AKH-II) byl v Ringerově roztoku vypitván mozek včely spolu s endokrinní žlázou *corpora cardiaca*. Adipokinetický hormon byl extrahován z tkáně 80% metanolem, který byl následně odpařen pomocí vakuové centrifugy. Odparek byl uschován v -80 °C do dalšího použití.

K získání včelího jedu byly v Ringerově roztoku pitvány jedové váčky společně s jedovou žlázou. Vzorky byly následně centrifugovány a uschovány v -80 °C do dalšího použití.

Reagencie:

- 80% methanol
- Aplikací pufr – 0,424 g Na₂CO₃ + 0,504 g NaHCO₃ na 100 ml dH₂O, pH 9,6
- Promývací pufr – 10mM PBS (zásobní roztok NaH₂PO₄ · 12 H₂O, KH₂PO₄, ředění 1:9) + 0,1 ml Tween na 100 ml 10mM PBS, pH 7,5
- Blokovací pufr – 1 g Skim milk Powder (Sigma-Aldrich) na 20 ml promývacího pufru
- Substrát Sigma T444 (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine)
- 0,5M H₂SO₄ (PENTA, 20450-12500)

3.5.1 Stanovení hladiny AKH v CNS

Protilátky:

- Primární protilátka: Rabbit anti-Schgr AKH II antisérum (Pineda – Berlín, Německo)
- Sekundární protilátka: HRP (Horseradish peroxidase) Goat anti-rabbit IgG antisérum (ThermoFisher Scientific, MA, USA)

Postup:

Vzorky obsahující CNS byly rozpuštěny ve 100 µl aplikací pufru pomocí vaničkového sonikátoru a přeneseny do jamek mikrodestičky. Jako blank bylo použito 100 µl aplikací pufru. Ke vzorkům byla na destičku přidána i kalibrační křivka, jako standard byl použit hormon Schgr-AKH II. Destička byla inkubována přes noc při 4 °C. Po inkubaci byly vzorky třikrát promyty 200 µl promývacího pufru a dále k nim bylo přidáno 200 µl blokovacího pufru. Vzorky byly inkubovány 2 hodiny při 37 °C. Následně bylo zopakováno promývání,

ke vzorkům bylo přidáno 100 µl roztoku obsahujícího primární protilátku (ředění 1:5000) a destička byla inkubována 1 hodinu při 37 °C. Po inkubaci byly vzorky opět promyty promývacím pufrem, bylo k nim přidáno 100 µl roztoku obsahující sekundární protilátku (ředění 1:5000) a byla zopakována inkubace po dobu 1 hodiny při 37 °C. Dále byly vzorky šestkrát promyty promývacím pufrem a ke každému z nich bylo přidáno 100 µl substrátu Sigma T444, 3,3',5',5'-tetramethylbenzidinu. Následovala další inkubace po dobu 45 minut ve tmě při 37 °C. Reakce byla zastavena pomocí 50 µl 0,5M H₂SO₄. Absorbance byla měřena na ELISA readeru (Molecular Devices) při vlnové délce 450 nm. Výsledky byly vyhodnoceny podle kalibrační křivky hormonu Schgr-AKH II.

3.5.2 Stanovení hladiny vitellogeninu v jedové žláze

Protilátky:

- Primární protilátka: Rabbit anti-vitellogenin antisérum (Laboratoř fyziologie hmyzu, Entomologický ústav, Biologické centrum AVČR, České Budějovice) (Kodrík a kol, 2022)
- Sekundární protilátka: HRP (Horseradish peroxidase) Goat anti-rabbit IgG antisérum (ThermoFisher Scientific, MA, USA)

Postup:

Do jamek mikrodestičky bylo napipetováno 100 µl aplikačního pufru a 1 µl surového včelího jedu. Následný postup byl identický s postupem uvedeným v podkapitole 3.5.1. Došlo pouze k použití jiné primární protilátky, a to konkrétně Rabbit anti-vitellogenin antisérum (ředění 1:5000).

3.5.3 Stanovení hladiny melittinu v jedovém včáčku

Protilátky:

- Primární protilátka: Rabbit anti-melittin antisérum (Biomatik Corporation, Kitchener, Ontario, Canada)
- Sekundární protilátka: HRP (Horseradish peroxidase) Goat anti-rabbit IgG antisérum (ThermoFisher Scientific, MA, USA)

Postup:

Do jamek mikroadestičky bylo napipetováno 100 μ l aplikačního pufru a 1 μ l surového včelího jedu. Následný postup byl identický s postupem uvedeným v podkapitole 3.5.1. Došlo pouze k použití jiné primární protilátky, a to konkrétně k Rabbit anti-melittin antisérum (ředění 1:20000).

3.6 Relativní exprese AKH v CNS

Příprava vzorku tkáně – včelí mozky byly vypreparovány a umístěny do RNAase-free mikrozkuvek (aliquot tří mozků v pěti biologických opakování pro každou skupinu) s 200 μ l roztoku TRI Reagent® (Sigma-Aldrich) a uchovány v -80 °C.

3.6.1 Izolace RNA

Tkáň byla homogenizována v roztoku TRI Reagent® (Sigma-Aldrich) dle návodu výrobce. Následně byly jednotlivé fáze odděleny pomocí chloroformu a k vodné fázi byl přidán isopropanol. Získaná RNA byla promyta 75% ethanolem, vysušena a následně rozpuštěna v 30 μ l H₂O. K odstranění případné kontaminace zbytkovou gDNA byl následně použit TURBO DNA-free™ Kit (Invitrogen), bylo postupováno dle návodu výrobce.

3.6.2 Reverzní transkripce

Následně byl 1 μ g total RNA použit pro přípravu cDNA (komplementární DNA) pomocí reverzní transkripce. K reverzní transkripci byl použit RevertAid RT Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher) za použití random hexamer (součást kitu) a Oligo dT (Generi biotech) primerů v poměru 1:1. Dále bylo postupováno dle pokynů výrobce kitu. Získaná cDNA byla skladována v -80 °C.

3.6.3 q-RT-PCR

Specifické primery pro AKH byly navrženy dle sekvence genu pro Schgr-AKH II u *A. mellifera* dostupné v databázi GenBank (JN983824.1), jako referenční gen byl použit gen rp49-ribosomal protein 49 (NM 0010 11587). Před provedením samotné q-RT-PCR byla

ověřena funkčnost připravených primerů pomocí běžné PCR. Produkty reakce byly zviditelněny na 1% agarozovém gelu. Primery použité pro q-RT-PCR jsou uvedeny v následující tabulce:

Tabulka I: Primery pro q-RT-PCR

Název		Sekvence primerů (5' - 3')
AKH	Forward	ATGGCCTTCTGGTTTTGGATA
AKH	Reverse	TTGGGTGACAGAAGATTT
rp 49	Forward	AAGTTCATTCGTCACCAGAG
rp 49	Reverse	CTTCCAGTTCCTTGACATTATG

q-RT-PCR byla provedena za použití TP SYBR 2x Master Mix (Top-Bio), 10 μ M každého z primerů a 10x naředěné cDNA. Celkový objem jedné reakce byl 14 μ l (3 μ l cDNA, 7 μ l TP SYBR 2x Master mix, 3,3 μ l dH₂O, 0,35 μ l Fw + 0,35 μ l Rv primer). Samotné měření bylo prováděno pomocí přístroje CFX 1000 Touch Real – Time Cycler (Bio-Rad), pro něž byl užit následující protokol: počáteční denaturace 3 minuty při 90 °C, vlastní cyklus: 15 sekund denaturace při 94 °C; nasednutí primerů (annealing) 20 sekund při 58 °C; elongace 25 sekund při 72 °C, opakování 40 cyklů. Získaná data byla analyzována pomocí programu Bio – Rad CFX Manager.

3.7 Stanovení hladiny oxidativního stresu

Jednotlivé markery oxidativního stresu (viz níže) byly měřeny ve střevě a tukovém tělese. Orgány byly pitvány do 100 μ l reakčního pufru a homogenizovány pomocí sonikátoru. K samotným reakcím byl použit vždy konkrétní ekvivalent tkáně.

3.7.1 Enzymatická aktivita katalázy (CAT)

Enzymatická aktivita katalázy byla měřena pomocí kitu Amplex Red Catalase Assay Kit (ThermoFisher).

Reagencie:

- Amplex Red reagencie

- DMSO (Dimethylsulfoxid)
- 3% H₂O₂
- HRP (Horseradish peroxidase)
- Reakční pufr – 0,5 M Tris-HCl, pH 7,5
- Kataláza

Pracovní roztoky:

- 10 mM Amplex Red reagensie – 0,26 mg reagensie + 100 µl DMSO
- 1x reakční pufr – 4 ml 5x reakčního pufru + 16 ml dH₂O
- 100 U/ml HRP – HRP + 200 µl 1x reakčního pufru
- 20 mM H₂O₂ – 1 µl 3% H₂O₂ + 200 µl dH₂O
- 40 mM H₂O₂ – 10 µl 20 mM H₂O₂ + 4990 µl 1x reakčního pufru
- 1000 U/ml katalázy – kataláza + 100 µl dH₂O
- 0,4 /ml HRP Amplex Red/HRP - 50 µl 10 mM Amplex Red reagensie + 20 µl 100 U/ml HRP + 4,93 ml 1x reakčního pufru

Postup:

Vlastní vzorky byly naředěny reakčním pufrem na koncentraci 2 µg tkáň/µl. Ekvivalent 25 µl roztoku vzorku byl nanesen na mikrodestičku, jako blank bylo použito 25 µl reakčního pufru. Ke vzorkům bylo přidáno 25 µl 40 mM H₂O₂. Následně byly vzorky inkubovány ve tmě při pokojové teplotě po dobu 30 minut. Ve druhé fázi bylo ke každému vzorku přidáno 50 µl Amplex Red/HRP pracovního roztoku a mikrodestička byla inkubována při 37 °C po dobu 30 minut ve tmě. Pomocí ELISA readeru (Molecular Devices) byla měřena absorbance vzorků při vlnové délce 560 nm. Výsledky byly vyhodnoceny podle kalibrační křivky katalázy.

3.7.2 Enzymatická aktivita superoxid dismutázy (SOD)

Enzymatická aktivita superoxid dismutázy byla měřena pomocí kitu SOD Assay Kit-WST (Sigma Aldrich).

Reagensie:

- WST roztok (Dojindo's highly water-soluble tetrazolium salt)

- Roztok enzymu
- Pufr
- Ředící pufr

Pracovní roztoky:

- WST pracovní roztok – 1 ml WST + 19 ml pufru
- Enzymatický pracovní roztok – 15 μ l původního roztoku enzymu + 2,5 ml ředící pufru

Postup:

Vlastní vzorky byly naředěny puftrem na koncentraci 2 μ g/ μ l. Ekvivalent 20 μ l roztoku vzorku byl nanesen na mikrodestičku, 20 μ l téhož roztoku bylo použito jako blank 2, jako blank 1 a 3 bylo použito 20 μ l ddH₂O. Následně bylo do každé jamky přidáno 200 μ l WST pracovního roztoku. Do jamek obsahujících blank 2 a blank 3 bylo přidáno 20 μ l ředícího pufru. Do jamek obsahujících vlastní vzorky a blank 1 bylo aplikováno 20 μ l pracovního roztoku enzymu. Dále byly vzorky inkubovány po dobu 30 minut při 37 °C. Pomocí ELISA readeru (Molecular Devices) byla měřena absorbance vzorků při vlnové délce 450 nm. Výsledky byly vyhodnoceny podle kalibrační křivky WST roztoku.

3.7.3 Enzymatická aktivita glutathion-S-transferázy (GST)

Enzymatická aktivita glutathion S-transferázy byla měřena pomocí kitu Glutathione-S-Transferase (GST) Assay Kit (Sigma Aldrich).

Reagencie:

- DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)
- Vzorkový pufr
- CDNB substrát (1-chloro-2,4-dinitrobenzen)
- Redukovaný L-glutathion
- GST kontrola (0,25 mg/ml)

Pracovní roztoky:

- 200 mM redukovaný L-glutathion – 246 mg L-glutathionu + 4 ml M Ω H₂O
- Roztok substrátu – 9800 μ l DPBS + 100 μ l 200 mM L-glutathion + 100 μ l mM CDNB

Postup:

Nejdříve byl připraven roztok substrátu. Vlastní vzorky i GST kontrola byly ředěny desítkovou řadou (např. 2 µl GST + 18 µl vzorkového pufru). Následně byly vzorky a kontrola nanесeny na UV destičku. Na UV destičku bylo aplikováno 20 µl každého vzorku, 20 µl roztoku substrátu jako blank a 4 µl GST + 16 µl pufru jako kontrola. Následně bylo do každé jamky přidáno 180 µl roztoku substrátu. Absorbance byla měřena 340 nm – kinetika, 10 minut po 1 minutě při 30 °C.

3.7.4 Celková antioxidantní aktivita (TAA)

Celková antioxidantní aktivita byla měřena pomocí kitu Antioxidant Assay Kit (Sigma-Aldrich).

Reagencie:

- Pufr
- Roztok zastavující reakci
- Myoglobin z koňského srdce
- Trolox – standard
- ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina))
- Fosfát-citrátový pufr, pH = 5
- H₂O₂, 3 % roztok

Pracovní roztoky:

- Pracovní roztok myoglobinu – 100x ředěný zásobní roztok
- ABTS zásobní roztok – 1 tableta ABTS + 1 tableta fosfát-citrátového pufru + 100 ml dH₂O
- ABTS pracovní roztok – 25 µl 3 % H₂O₂ + 10 ml ABTS zásobní roztok

Postup:

Na mikrodestičku bylo nanесeno 10 µl vzorku a 20 µl pracovního roztoku myoglobinu. Jako blank bylo nanесeno 10 µl pufru. Následně bylo do každé jamky přidáno 150 µl ABTS pracovního roztoku, pro blank byl použit roztok bez 3 % H₂O₂. Vzorky byly inkubovány 5

minut při 25 °C. Dále bylo přidáno 100 µl roztoku zastavujícího reakci. Pomocí ELISA readeru (Molecular Devices) byla měřena absorbance vzorků při vlnové délce 405 nm. Výsledky byly vyhodnoceny podle kalibrační křivky Trolox standardu.

3.8 Transmisní elektronová mikroskopie (TEM)

Zpracování vzorků probíhalo v Laboratoři elektronové mikroskopie (Parazitologický ústav, Biologické centrum) ve spolupráci s panem RNDr. Janem Černým.

Postup:

Hrudní létací svalovina včelích dělnic byla pitvána přímo do fixačního roztoku (2,5 % glutaraldehyd v 0,2 M fosfátovém pufru) a byla v něm fixována při 4 °C po dobu 7 dní. Poté byly vzorky třikrát promyty 0,1 M roztokem fosfátového pufru s 4 % glukózy, post-fixovány 4% roztok OsO₄ ve fosfátovém pufru po dobu 2 hodiny, opět promyty, dehydrovány řadou ethanolových roztoků a zality do pryskyřice Epon.

Ultratenké řezy byly připraveny pomocí ultramikrotomu (Leica Biosystems, Wetzlar, Německo) s diamantovým nožem a kontrastovány na síťkách uranyl acetátem a citrátem olova. Řezy byly následně vizualizovány pomocí transmisního elektronového mikroskopu JEOL JEM-1010 (JEOL, Tokio, Japonsko) a snímky byly pořízeny kamerou Sis MegaView III CCD (EMSIS, Münster, Německo).

3.9 Statistické zpracování výsledků

Výsledky byly podle potřeby zpracovány dle následujících statistických metod: jednocestná analýza variance (ANOVA) + Dunnett's multiple comparisons test. Následně byly zpracovány v programech Microsoft Excel 2021 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) a Prism (GraphPad Software 8, San Diego, California).

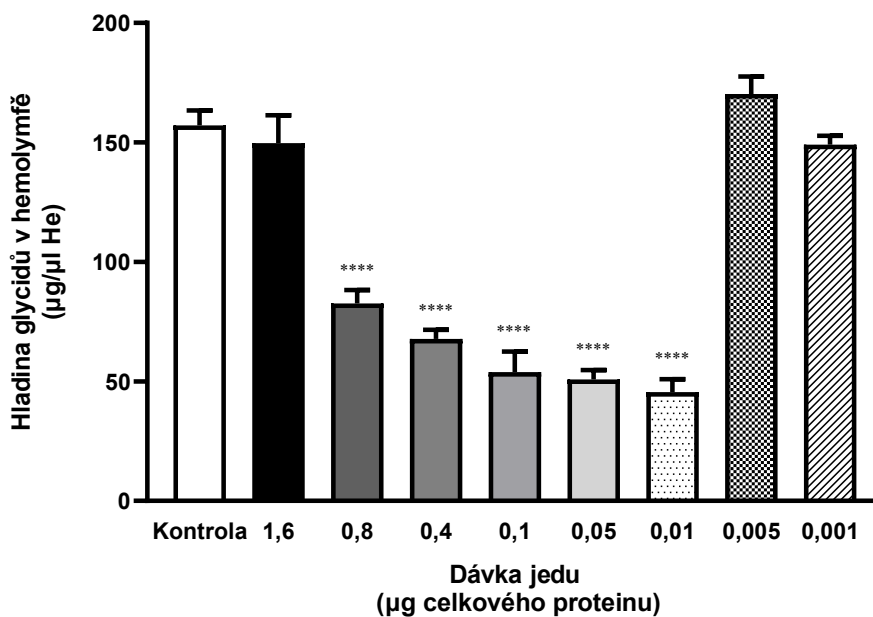
4 VÝSLEDKY

4.1 Účinky jedu lumčika skladištního (*H. hebetor*)

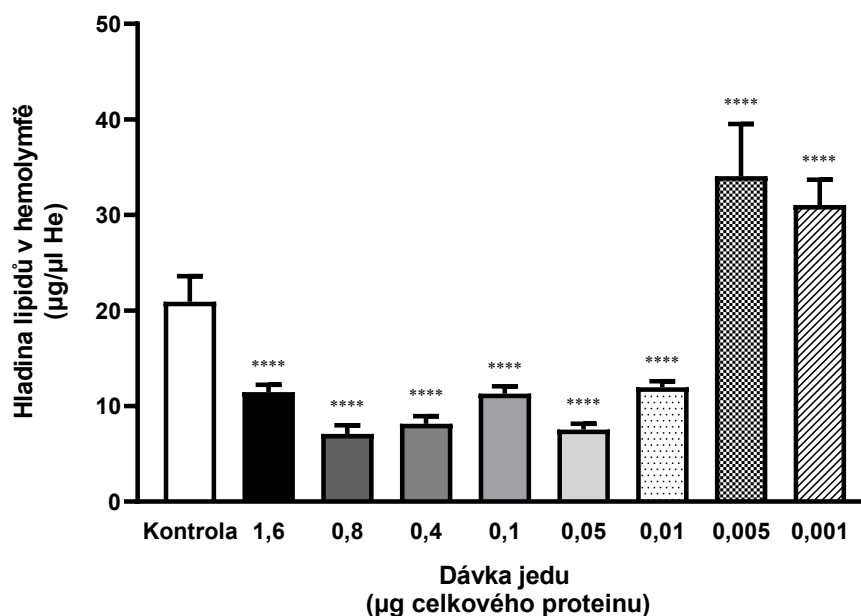
Jed lumčika skladištního vyvolává po aplikaci nervosvalovou paralýzu, která ovlivňuje pohybové schopnosti oběti. Proto byl v první části práce aplikován včelám tento jed v několika rozdílných dávkách: 1,6; 0,8; 0,4; 0,1; 0,05; 0,01; 0,005; 0,001 μg celkového proteinu, a byla vizuálně sledována následná reakce. Výsledky ukázaly rozdíly v časové odezvě na aplikaci jednotlivých dávek jedu. U nejvyšších dávek (1,6; 0,8; 0,04 μg celkového proteinu) byla paralýza pozorovatelná již půl hodiny po aplikaci. U nižších dávek (0,1; 0,05; 0,001 μg celkového proteinu) pak docházelo k paralýze v rozmezí 1-2 hodin po aplikaci. V těchto případech bylo také možné pozorovat lehké pohyby včel, jako třes končetin nebo stahy žihadlového aparátu. U posledních dvou nejméně koncentrovaných dávek k paralýze nedošlo a na včelách nebyly pozorovány žádné pohybové změny nebo omezení.

4.2 Vliv jedu lumčika skladištního na hladinu živin v hemolymfě

Hladina živin v hemolymfě při působení stresoru na organismus kolísá a je tak základním ukazatelem pro hodnocení vyvolaného stresu. Bylo zjištěno, že rozdílné dávky jedu lumčika skladištního (1,6; 0,8; 0,4; 0,1; 0,05; 0,01; 0,005; 0,001 μg celkového proteinu) ovlivňují hladinu glycidů a lipidů v hemolymfě včely medonosné. Následující graf ukazuje (Obr. 1), že hladina glycidů signifikantně klesala spolu se snižujícím se množstvím jedu a u nízkých dávek opět narostla k hodnotám, jež byly srovnatelné s kontrolní skupinou. Podobný trend byl pozorován i u grafu zobrazující hladinu lipidů (Obr. 2), kde také došlo k poklesu a následnému nárůstu naměřených hodnot. Z grafů lze také vyčíst, že hladina glycidů v hemolymfě byla několikanásobně vyšší, než tomu bylo u hladiny lipidů (např. u kontrolní skupiny včel byla hladina glycidů 7,5 vyšší než hladina lipidů), což naznačuje upřednostňování glycidů v energetickém metabolismu včel. Vliv jedu lumčika na hladinu živin v hemolymfě byl měřen hlavně z praktických důvodů, jelikož bylo nutné stanovit optimální dávku jedu, jež bude včelám aplikována. Pro včelí jed nebylo nutné tyto základní testy provádět, jelikož byla aplikována dávka, jež je standardně používána v naší laboratoři.



Obr. 1: Vliv rozdílných dávek jedu lumčička skladištního na hladinu glycidů v hemolymfě včely medonosné, 24 hodin po aplikaci. Statisticky významné rozdíly mezi kontrolní skupinou a skupinami ošetřenými jedem (průměr ± SD, n=10) byly testovány pomocí jednocestné analýzy variance s Dunnettovým post-testem (****p < 0,0001).

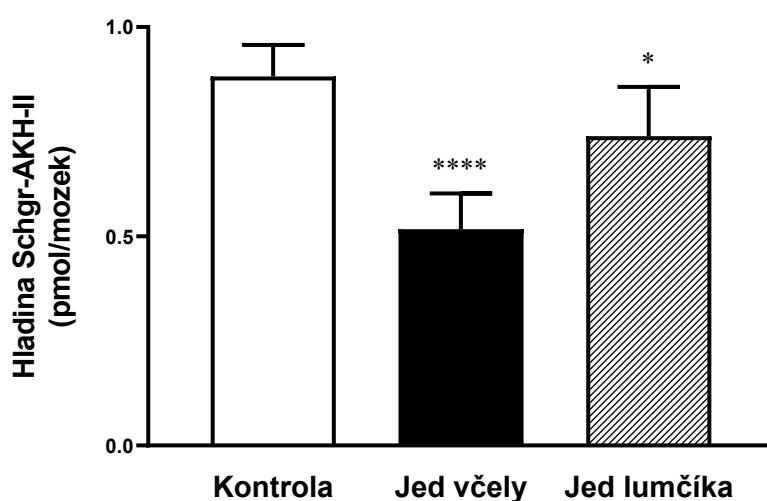


Obr. 2: Vliv rozdílných dávek jedu lumčička skladištního na hladinu lipidů v hemolymfě včely medonosné, 24 hodin po aplikaci. Statisticky významné rozdíly mezi kontrolní skupinou a skupinami ošetřenými jedem (průměr ± SD, n=10) byly testovány pomocí jednocestné analýzy variance s Dunnettovým post-testem (****p < 0,0001).

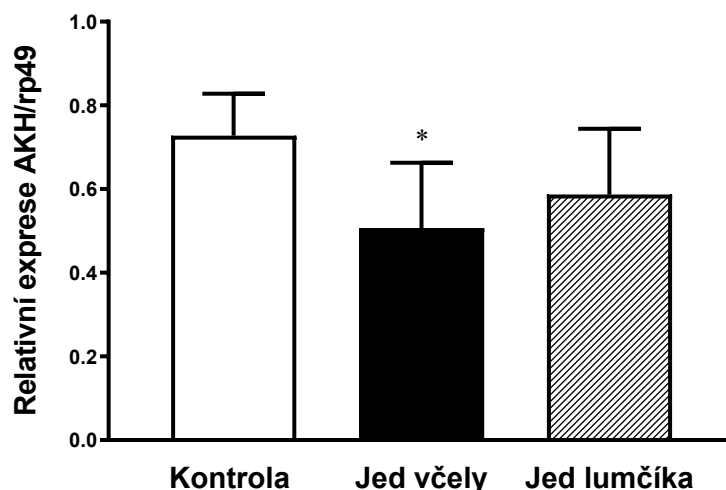
4.3 Vliv aplikovaných jedů na hladinu a expresi AKH v CNS

V důsledku aplikace jedů do těla včely došlo ke změně hladiny a exprese AKH v centrální nervové soustavě včely medonosné. Obr. 3 ukazuje, že po aplikaci obou jedů došlo k signifikantnímu snížení hladiny AKH v CNS. Po aplikaci včelího jedu se hladina snížila 1,7x oproti kontrolní skupině. U včel ošetřených jedem lumčička se hladina oproti kontrolní skupině snížila 1,3x.

Co se týče exprese genu pro AKH lze si všimnout podobného trendu (Obr. 4). Relativní exprese se průkazně snížila po aplikaci včelího jedu (0,4x oproti kontrolní skupině), u aplikace jedu lumčička skladištního se exprese AKH genu také mírně snížila, ale rozdíl nebyl statisticky významný.



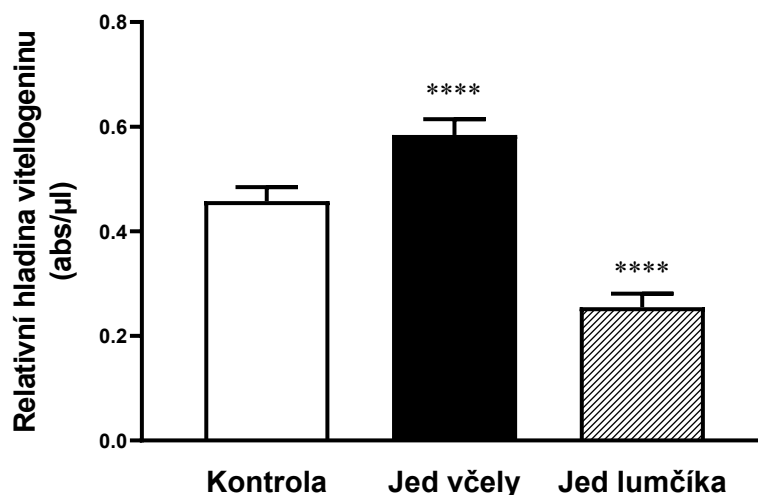
Obr. 3: Vliv jedu včely medonosné (7,1 µg melittinu) a lumčička skladištního (0,1 µg proteinu) na hladinu AKH v centrální nervové soustavě, 24 hodin po aplikaci. Statisticky významné rozdíly mezi kontrolní skupinou a skupinami ošetřenými jedem (průměr ± SD, n=16) byly testovány pomocí jednocestné analýzy variance s Dunnettovým post-testem (*p < 0,05; ****p < 0,0001).



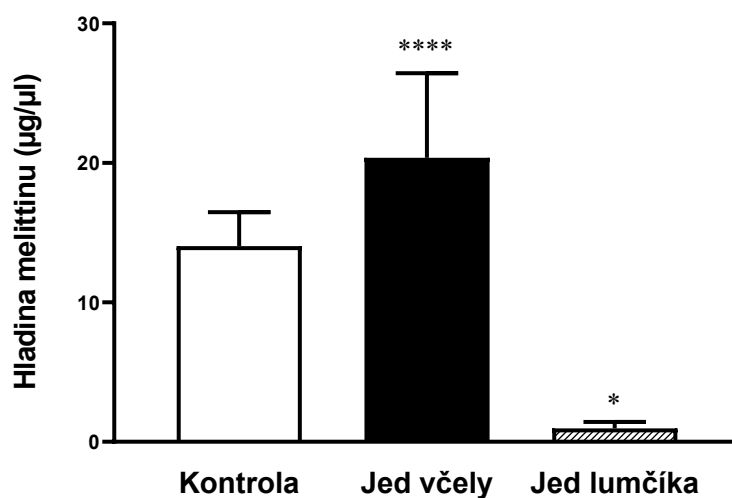
Obr.4: Vliv jedu včely medonosné (7,1 μg melittinu) a lumčička skladištního (0,1 μg proteinu) na expresi genu pro AKH v centrální nervové soustavě, 24 hodin po aplikaci. Statisticky významné rozdíly mezi kontrolní skupinou a skupinami ošetřenými jedem (průměr \pm SD, $n=16$) byly testovány pomocí jednocestné analýzy variance s Dunnettovým post-testem (* $p < 0,05$).

4.4 Vliv aplikovaných jedů na složení toxinů v jedovém včáčku

Působení stresorů, tj. externě aplikovaného vlastního včelího jedu i jedu lumčička může mimo jiné ovlivňovat i složení jedu včelího příjemce. Následující grafy (Obr. 5; Obr. 6) ukazují, že aplikace obou jedů vyvolala změny ve složení vitellogeninu i melittinu v jedu příjemce. Konkrétně bylo zjištěno, že aplikace včelího jedu způsobila 1,3násobný nárůst hladiny vitellogeninu v jedu oproti kontrolní skupině (Obr. 5) a stejně tak došlo k 1,4násobnému nárůstu hladiny melittinu (Obr. 6). Naopak aplikace jedu lumčička měla opačný efekt. Tento jed vyvolal 2,4násobný pokles hladiny vitellogeninu oproti kontrolní skupině (Obr. 5) a hladina melittinu se snížila dokonce 14násobně (Obr. 6), čímž dosáhla minimální hodnoty.



Obr. 5: Vliv jedu včely medonosné (7,1 μg melittinu) a lumčička skladištního (0,1 μg proteinu) na relativní hladinu vitellogeninu, 24 hodin po aplikaci. Statisticky významné rozdíly mezi kontrolní skupinou a skupinami ošetřenými jedem (průměr ± SD, n=25) byly testovány pomocí jednocestné analýzy variance s Dunnettovým post-testem (****p < 0,0001).

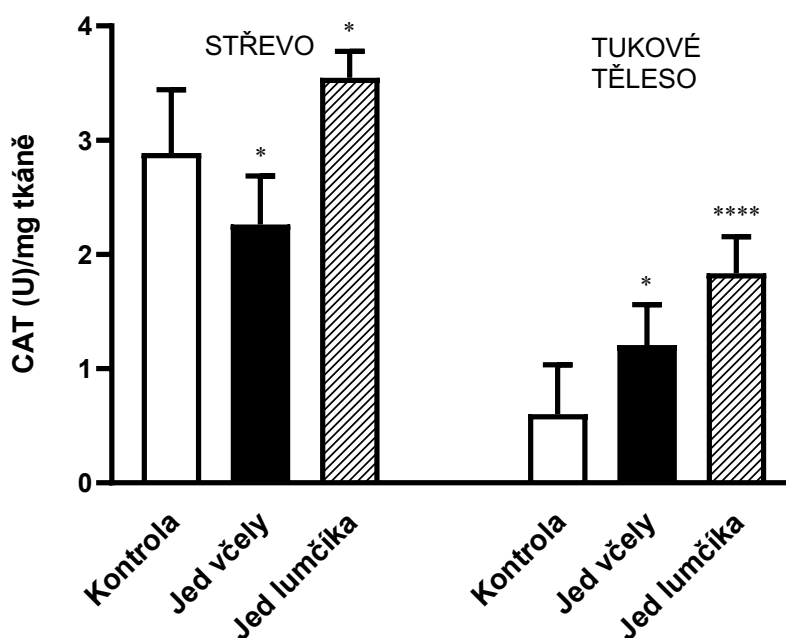


Obr. 6: Vliv jedu včely medonosné (7,1 μg melittinu) a lumčička skladištního (0,1 μg proteinu) na koncentraci melittinu v jedu jedového váčku, 24 hodin po aplikaci. Statisticky významné rozdíly mezi kontrolní skupinou a skupinami ošetřenými jedem (průměr ± SD, n=25) byly testovány pomocí jednocestné analýzy variance s Dunnettovým post-testem (*p < 0,05; ****p < 0,0001).

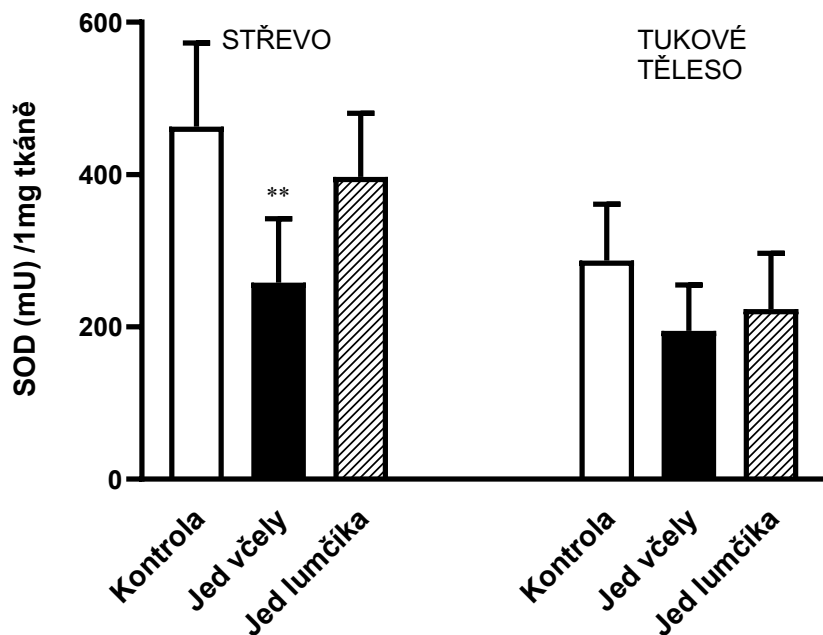
4.5 Oxidativní stres

Některé stresory mohou zvýšit hladinu reaktivních kyslíkových metabolitů (ROS) v organismu a vyvolat tak oxidativní stres. Jeho působení je mimo jiné omežováno antioxidantními enzymy jako je kataláza, superoxid dismutáza nebo glutathion-S-transferáza. Enzymatická aktivita katalázy (Obr. 7) a superoxid dismutázy (Obr. 8) byla po aplikaci včelího jedu ve střevě signifikantně snížena, u glutathion-S-transferázy (Obr. 9; Obr. 10) a při stanovení celkové antioxidantní aktivity (Obr. 11) ve střevě nebyly naměřeny významné rozdíly. Opačný vliv na aktivitu enzymů ve střevě měl jed lumčíka. Aktivita katalázy (Obr. 7), aktivita i kinetika glutathion-S-transferázy (Obr. 9; Obr. 10) a i celková antioxidantní aktivita (Obr. 11) byla po aplikaci jedu stimulována.

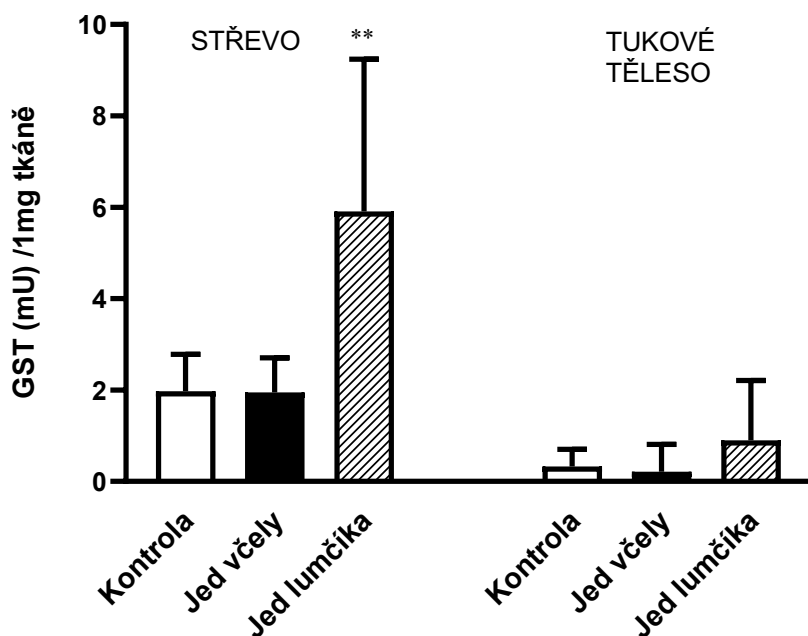
Aktivita antioxidantních enzymů byla v tukovém tělese nižší než ve střevě. U včelího jedu došlo v tukovém tělese pouze ke stimulaci aktivity katalázy (Obr. 7). U jedu lumčíka došlo k signifikantnímu zvýšení aktivity katalázy (Obr. 7), celková antioxidantní aktivita byla naopak inhibována (Obr. 11).



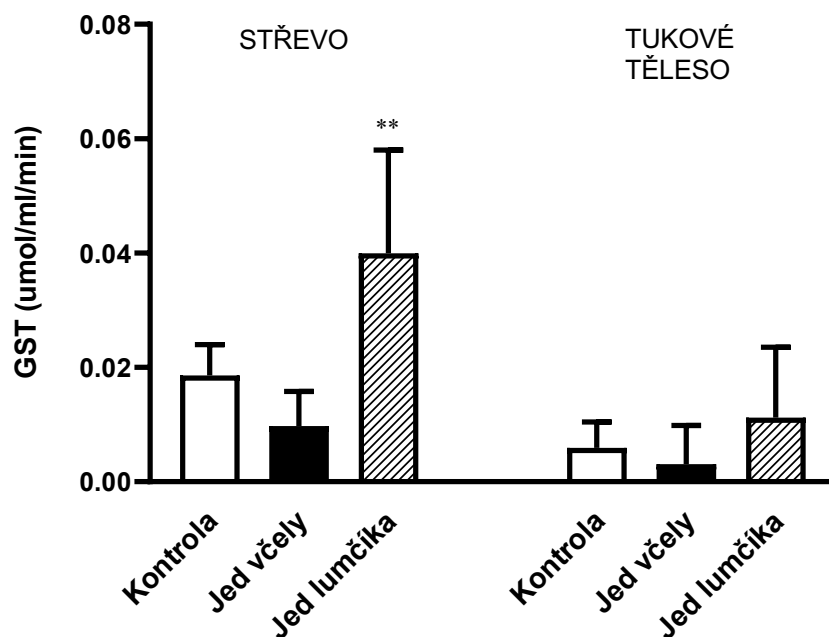
Obr. 7: Vliv jedu včely medonosné (7,1 μg melittinu) a lumčíka skladištního (0,1 μg proteinu) na aktivitu katalázy, 24 hodin po aplikaci. Statisticky významné rozdíly mezi kontrolní skupinou a skupinami ošetřenými jedem (průměr \pm SD, $n=10$) byly testovány pomocí jednocestné analýzy variance s Dunnettovým post-testem (* $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$).



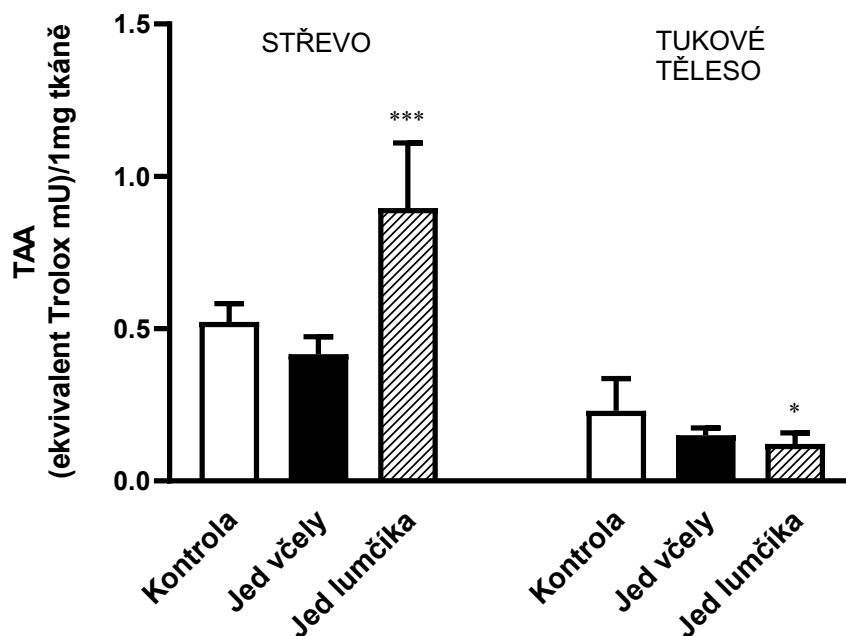
Obr. 8: Vliv jedu včely medonosné (7,1 μg melittinu) a lumčička skladištního (0,1 μg proteinu) na aktivitu superoxid dismutázy ve střevě a tukovém tělese, 24 hodin po aplikaci. Statisticky významné rozdíly mezi kontrolní skupinou a skupinami ošetřenými jedem (průměr \pm SD, $n=10$) byly testovány pomocí jednocestné analýzy variance s Dunnettovým post-testem (* $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$).



Obr. 9: Vliv jedu včely medonosné (7,1 μg melittinu) a lumčička skladištního (0,1 μg proteinu) na aktivitu glutation-S-transferázy ve střevě a tukovém tělese, 24 hodin po aplikaci. Statisticky významné rozdíly mezi kontrolní skupinou a skupinami ošetřenými jedem (průměr \pm SD, $n=10$) byly testovány pomocí jednocestné analýzy variance s Dunnettovým post-testem (** $p < 0,01$).



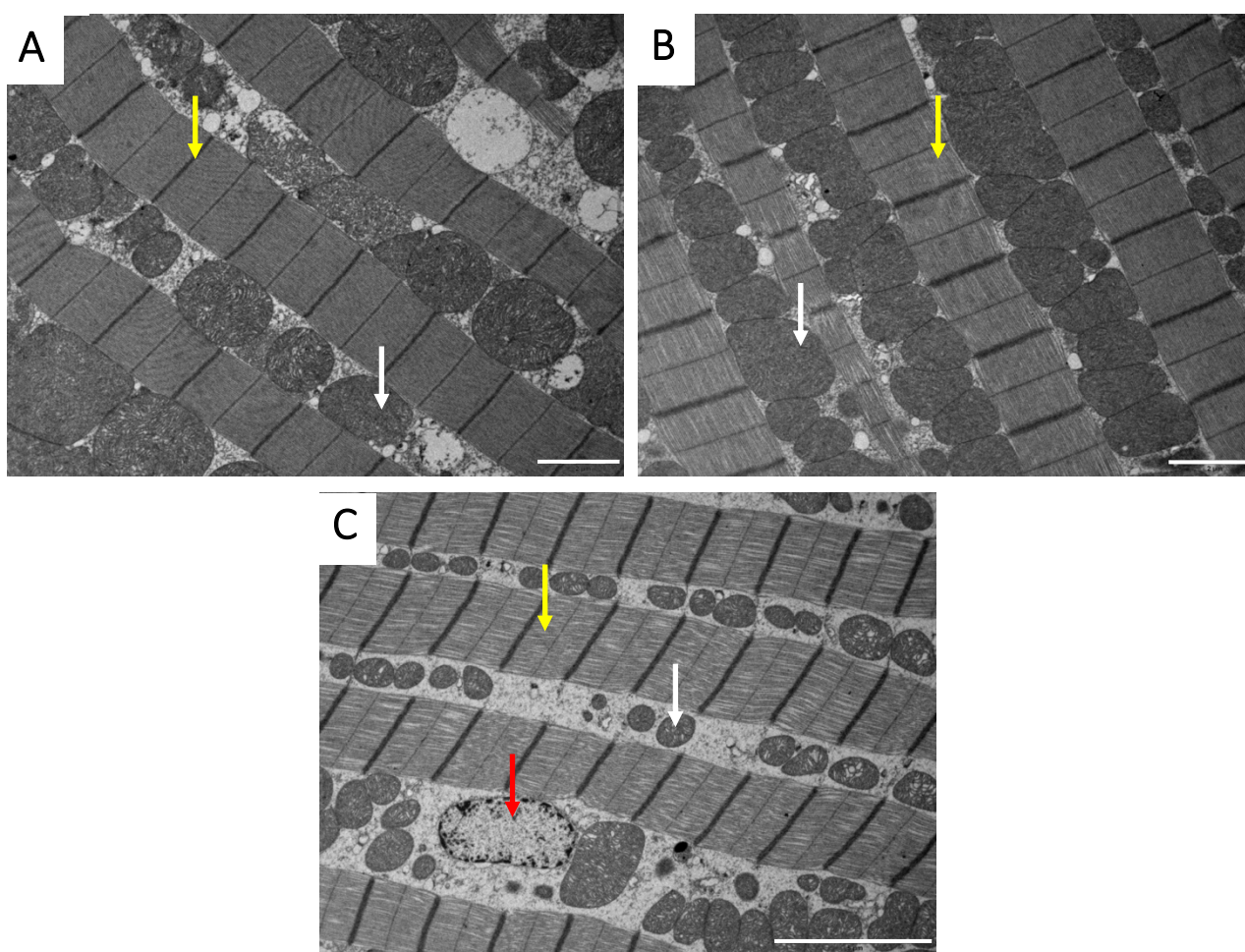
Obr. 10: Vliv jedu včely medonosné (7,1 μg melittinu) a lumčička skladištního (0,1 μg proteinu) na kinetiku enzymatické reakce glutation s-transferázy ve střevě a tukovém tělese, 24 hodin po aplikaci. Statisticky významné rozdíly mezi kontrolní skupinou a skupinami ošetřenými jedem (průměr \pm SD, $n=10$) byly testovány pomocí jednocestné analýzy variance s Dunnettovým post-testem (** $p < 0,01$).



Obr. 11: Vliv jedu včely medonosné (7,1 μg melittinu) a lumčička skladištního (0,1 μg proteinu) na celkovou antioxidantní aktivitu ve střevě a tukovém tělese, 24 hodin po aplikaci. Statisticky významné rozdíly mezi kontrolní skupinou a skupinami ošetřenými jedem (průměr \pm SD, $n=10$) byly testovány pomocí jednocestné analýzy variance s Dunnettovým post-testem (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

4.6 Transmisní elektronová mikroskopie

Pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM) byly pozorovány účinky jedů na ultrastrukturu/strukturu svalové tkáně thoraxu (létací svaly) u včely medonosné. Tato analýza ukázala, že po aplikaci včelího jedu prakticky nedošlo k poškození svalové tkáně ani nebyla porušena struktura mitochondrií (Obr. 12B), snímky se významně neodlišují od kontrolní skupiny (Obr. 12A). Lehké poškození aktin-myozinového komplexu způsobil jed lumčička skladištního, na mitochondrie však neměl účinek ani tento jed (Obr. 12C).



Obr. 15: Vliv jedu včely medonosné (7,1 µg melittinu) a lumčička skladištního (0,1 µg proteinu) na ultrastrukturu thorakálních svalů včely medonosné (struktura mitochondrií), 24 hodin po aplikaci: analýza pomocí TEM. (A) kontrolní skupina (Ringerův roztok); (B) aplikace včelího jedu; (C) aplikace jedu lumčička; žlutá šipka – myofibrily, bílá šipka – mitochondrie; červená šipka – jádro; (A, B) měřítko 2 µm; (C) měřítko 5 µm.

5 DISKUZE

K vyvolání antistresové fyziologické reakce včely medonosné *A. mellifera* L. byl použit vlastní jed včely medonosné a jed lumčíka skladištního *H. hebetor* L. Tyto jedy mají zcela odlišný mechanismus účinku a jejich producenti je využívají k jiným účelům. Lze je tedy považovat za odlišné stresory a očekávat odlišné antistresové reakce, jež v těle včely vyvolávají.

Včelí jed – konkrétně jeho hlavní toxin melittin - způsobuje narušení buněčné membrány, které vede k lyzi samotné buňky a uvolnění zánětlivých mediátorů (Shi a kol, 2022). Jeho primární funkce je obranná/útočná a včelám slouží hlavně v boji proti jedincům vlastního druhu při ochraně nebo napadání úlu, případně k obraně proti dalším příslušníkům řádů blanokřídlých (*Hymenoptera*) jako jsou vosy nebo sršni. Mechanismus účinku jedu lumčíka skladištního není stále zcela popsán. Víme, že jed působí na receptory na presynaptické membráně nervosvalového spojení a blokuje zde glutamátovou signální dráhu (Pennacchio a Strand, 2006). Parasitoidní vosička tento jed využívá k znehybnění larev, do kterých naklade vajíčka, a které pak slouží jako potrava pro její potomky. Jed tedy neslouží ani k obraně ani k útoku, ale je součástí rozmnožovacího cyklu lumčíka.

V první části práce bylo nutno určit jaká dávka jedu lumčíka skladištního bude využívána k vyvolání antistresových reakcí. Většina výzkumů, jež byla publikována, se zabývá účinkem jedu lumčíka na larvy hmyzu z řádu *Lepidoptera* a *Coleoptera*, jež jsou jeho hostiteli (Pennacchio a Strand, 2006; Altuntas a kol., 2010; Sláma a Lukáš, 2011). Nicméně, bylo prokázáno, že tento jed účinkuje i na dospělce z řádu *Hemiptera*, ačkoliv se jedná o vysoké dávky (Drenth, 1974; Shaik a kol., 2017). Pro včelu bylo tedy nutné optimální dávku nalézt. Včely byly ošetřeny osmi různými dávkami jedu pohybujících se mezi 1,6 až 0,001 μg celkového proteinu. Celková paralýza byla viditelná již hodinu po aplikaci jedu u všech dávek kromě posledních dvou nejméně koncentrovaných, kde se jed vyskytoval již jen ve stopovém množství. Je tedy zřejmé, že organismus včel je na tento jed velice citlivý, a i přes jeho nízkou koncentraci zde dochází k paralýze. Přes vzniklou paralýzu bylo pouhým pozorováním obtížné stanovit, zda není některá z dávek obsahující vyšší koncentraci jedu pro včelu smrtelná. Proto byla pro další pokusy zvolena dávka odpovídající 0,1 μg proteinu, po jejíž aplikaci si bylo možno všimnout lehkého třesu končetin a také pulzace žihadla a s jistotou tak určit, že je včela naživu.

Následně byl provedený základní pokus pro hodnocení antistresových reakcí, a to měření hladiny živin v hemolymfě. Výsledky ukázaly, že aplikace jedu lumčíka sleduje stejný trend v hladině glycidů i lipidů v hemolymfě. Ukázalo se, že hladiny klesají společně s dávkou jedu, jež je včelám podávána a při velice nízkých koncentracích se tato hladina vrací opět k hodnotám kontrolní skupiny včel. Tento jev je obtížné vysvětlit, je ale možné že souvisí s intenzitou vyvolané paralýzy; tuto hypotézu je však nutné podpořit dalšími výzkumy. Nicméně, zajímavé je si zde také všimnout, že hladina glycidů v hemolymfě včely byla až 10x vyšší než hladina lipidů. Jednoduchým vysvětlením je, že včela využívá jako hlavní zdroj energie právě glycidy, které tvoří základní složku její potravy. Podobně tomu například je i u švába amerického *Periplaneta americana* (Bodláková, 2018).

Jak je již zmíněno v úvodu, adipokinetické hormony se velkou měrou podílejí na antistresové odpovědi hmyzu. Kolísání jejich hladiny v CNS a hemolymfě je závislé na typu stresoru, intenzitě jeho působení a také na čase, po který na organismus působí (Kodřík a Socha, 2005). Je důležité zmínit, že závislost mezi biosyntézou AKH v *corpora cardiaca* a jeho zvýšenou hladinou v hemolymfě není ve většině případů korelována. Ukázalo se, že u některých druhů hmyzu je při působení stresoru do hemolymfy uvolňováno zásobní AKH, ale jeho exprese v CNS není přímo ovlivněna (Diederer, 2002). U včel tomu není jinak, a i zde dochází ke kolísání hladiny AKH v CNS a ke změnám jeho exprese po působení různých stresorů. Bylo zjištěno, že hladina AKH v CNS se u včel po aplikaci včelího jedu snižovala (Kainzová, 2021) a podobně tomu bylo i po aplikaci insekticidu (Prokůpková, 2022). Zajímavé je srovnání s jinými druhy hmyzu, kde naopak docházelo ke zvyšování hladiny AKH v CNS (Kodřík a Socha, 2005; Bodláková a kol, 2018; Vinokurov a kol., 2014). V mé práci se ukázalo, že hladina AKH v CNS se po aplikaci obou jedů snižuje. Jedním z možných vysvětlení by mohlo být, že pod vlivem stresoru dochází k uvolnění AKH do hemolymfy a jeho hladina v CNS tak klesá.

Expresí genu pro AKH po aplikaci jedu lumčíka se zabýval Shaik a kol. (2017) u plošnice *Pyrrhocoris apterus*, výsledky ukázaly významné několikanásobné zvýšení této exprese. Z výsledků mé práce naopak plyne, že exprese genu pro AKH se po aplikaci vlastního jedu u včely prokazatelně snížila, nicméně po aplikaci jedu lumčíka se neukázal prokazatelný rozdíl. Vypadá to tedy, že exprese genu pro AKH je druhově nebo stresorově specifická, jak uvádí ve své práci Diederer (2002).

Další část práce se zabývala změnami ve složení včelího jedu po aplikaci jedů, a to konkrétně změnou hladiny vitellogeninu a melittinu. Vitellogenin, jež je znám hlavně jako prekurzor vaječného žloutku, ale v poslední době se ukazuje, že hraje důležitou roli i v obranných reakcích hmyzu. Je například součástí imunitního systému a slouží také jako obrana proti oxidativnímu stresu (Kodrík a kol., 2019; 2023). V četných výzkumech bylo zjištěno, že jeho hladina v hmyzím těle (hemolymfa, tukové těleso) po vlivem různých stresorů kolísá (Kodrík a kol., 2019; Park a kol., 2018; BenVau a Nieh, 2017). V práci Ondřichová a kol. (2023) se ukázalo, že po aplikaci včelího jedu do těla *P. apterus* dochází k výraznému poklesu hladiny vitellogeninu v hemolymfě, podobně tomu bylo i u švába *P. americana* (Bodláková a kol., 2022). Jak je již výše zmíněno, i ve včelím jedu bylo nalezeno malé množství vitellogeninu, který zde nejspíše funguje jako alergen (Blank a kol., 2013, Park a kol., 2018). Nedávno bylo zjištěno, že jeho hladina v jedu včely se mění v průběhu roku (Kodrík a kol., 2022). Hladina melittinu v jedu také kolísá během roku a zároveň se mění s věkem včely (Owen a Pfaff, 1995). Ze získaných výsledků mé práce plyne, že hladina melittinu v jedu po aplikaci včelího jedu vzrostla a stejně tak tomu bylo i u hladiny vitellogeninu. Naopak po aplikaci jedu z lumčíka došlo k výraznému poklesu hladiny obou složek. Tuto rozdílnou reakci není jednoduché vysvětlit, zřejmě však souvisí s rozdílným mechanismem působení obou jedů. Vliv vlastního jedu vyvolal klasickou antistresovou reakci spojenou s vyšší produkcí toxinů jedu. Naopak paralýza způsobená jedem lumčíka měla zřejmě vliv i na syntetický aparát včelí jedové žlázy. Nelze ani vyloučit že jed lumčíka nějakým neznámým mechanismem ovlivňuje složení jedu a působí na jeho složky. Je však nutné říci, kolísání jednotlivých složek jedu po setkání včely se stresorem není objasněno a vyžaduje si další výzkum.

Působení stresorů může dále vyvolávat i oxidativní stres, jež je způsobený zvýšenou hladinou reaktivních kyslíkových metabolitů (ROS). Jedním z mechanismů, jimiž se organismus brání proti oxidativnímu stresu je přeměna ROS na stabilní molekuly pomocí antioxidačních enzymů. Mezi tyto enzymy patří kataláza, superoxid dismutáza nebo glutathion-S-transferáza. Jejich zvýšená aktivita v organismu tedy značí probíhající oxidativní stres (Nguyen a kol., 2022). Ukázalo se, že například u *P. apterus* došlo po aplikaci herbicidů a insekticidů ke zvýšení aktivity antioxidačních enzymů (Večeřa a kol., 2007, Velki a kol., 2011). Na druhou stranu jiný výzkum ukázal, že aplikace včelího jedu do těla švába *P. americana* nijak neovlivnila hladinu těchto enzymů (Bodláková a kol., 2022). Výsledky této práce ukazují, že včelí jed prokazatelně snižuje

aktivitu katalázy a superoxid dismutázy ve střevě včely, a naopak aktivita katalázy je v tukovém tělese prokazatelně zvýšena. Další měření neukazují signifikantní rozdíly. Z výsledků vyplývá, že tato antistresová reakce je nejspíše druhově nebo stresorově specifická. Zajímavé výsledky ukázala měření aktivity antioxidantních enzymů ve střevě po aplikaci jedu lumčíka. Zde došlo k významnému nárůstu celkové antioxidantní kapacity i k nárůstu aktivit jednotlivých enzymů. Můžeme tedy říci, že tento jed vyvolává v těle včely oxidativní stres. U tukového tělesa už nejsou výsledky tak jednoznačné, zde došlo ke zvýšení aktivity katalázy, celková antioxidantní aktivita však byla snížena. Lze si také všimnout, že aktivita všech enzymů (i celková antioxidantní kapacita) je ve střevě znatelně vyšší než v tukovém tělese. Včela má relativně malé tukové těleso, jelikož má k dispozici potravu prakticky po celý rok a nemusí si tedy dělat velké vnitřní zásoby. Také relativně nízká aktivita antioxidantních enzymů tuto omezenou funkci tukového tělesa u včel potvrzuje.

Kromě toho, že včelí jed narušuje buněčné membrány a poškozuje struktury buněk, vyvolává v těle oběti širokou škálu dalších reakcí, které zefektivňují jeho toxické působení (Lubawy a kol., 2019). O jeho hlavním jedu melittinu je známo, že vyvolává také poškození svalových vláken vedoucí až k myonekróze, což bylo prokázáno například u myši (Ownby a kol., 1997; Florea a kol., 2018) nebo i člověka (Betten a kol., 2006). Působení včelího jedu vyvolalo rozsáhlé poškození myofibril vedoucích také u švába *P. americana* (Bodláková a kol., 2022). Z provedených pokusů vyplývá, že u včely medonosné nedošlo k žádnému zjevnému poškození svalových vláken po aplikaci včelího jedu. Je možné, že působení tohoto jedu na svalová vlákna je druhově specifické. Dalším možným vysvětlením je, že záleží na aplikované dávce a na délce působení jedu. Jed lumčíka skladištního působí na receptory nervosvalových synapsí a vyvolává také rozsáhlé poškození myofibril i mitochondrií u různých druhů hmyzu zatím ne zcela známým mechanismem (Kodrík a kol., nepublikováno). Ze snímků pořízených v rámci této diplomové práce se zdá, že jed lumčíka způsobuje mírné poškození myofibril svalových vláken létacích svalů včely. Další vlivy jedu lumčíka na ultrastrukturu svalových buněk jsou v naší laboratoři intenzivně studovány.

6 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo sledovat biochemické a fyziologické obranné reakce v těle včely medonosné (*A. mellifera*) po aplikaci vlastního jedu a jedu lumčička skladištního (*H. hebetor*). A následně vyvolané antistresové odpovědi porovnat. Bylo zjištěno následující:

1. Jed lumčička skladištního vyvolal paralýzu včely medonosné, a to i při aplikaci velmi nízkých dávek. Vliv jedu na hladinu živin v hemolymfě (glycidy, lipidy) byl variabilní, záleželo na aplikované dávce.
2. Hladina AKH v CNS byla prokazatelně snížena po aplikaci obou jedů. Exprese genu pro AKH byla snížena jen po aplikaci včelího jedu.
3. Na složení jedu z jedového váčku včely měly vliv oba jedy. Zatímco včelí jed hladinu vitellogeninu a melittinu v jedu snižoval, jed lumčička měl opačný efekt.
4. Aktivita antioxidantních enzymů ve střevě byla ovlivněna oběma jedy. Včelí jed aktivitu většiny enzymů ve střevě inhiboval, zatímco jed lumčička aktivitu prokazatelně stimuloval. U tukového tělesa byla celková aktivita enzymů nižší než ve střevě a rozdíly nebyly ve většině měření signifikantní.
5. Snímky pořízené pomocí transmisní elektronové mikroskopie ukázaly, že jed lumčička poškozuje jednotlivé myofibrily. Po aplikaci včelího jedu nebyly na struktuře pozorovány téměř žádné změny.

Závěrem lze říci, že účinky včelího jedu a jedu lumčička skladištního na organismus včely medonosné se výrazně liší.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Adamo, S. A. (2014). Stress Responses in Insects. *Annual Review of Entomology*, 59, 209-226.

Altuntaş, H., Kilic, A. Y., & Sivas, H. (2010). The effects of parasitism by the ectoparasitoid *Bracon hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae) on host hemolymph proteins in the Mediterranean flour moth *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). *Turkish Journal of Zoology*, 34(3), 409-416.

Amdam, G.V., Aase, A.L. T. O., Seehuus, S. C., Kim Fondrk, M., Norberg, K., & Hartfelder, K. (2005). Social reversal of immunosenescence in honey bee workers. *Experimental Gerontology*, 40(12), 939-947.

Banks, B. E. C., & Shipolini, R. A. (1986). Chemistry and pharmacology of honey-bee venom. In *Venoms of Hymenoptera* (pp. 330-403). Academic Press Inc

Blank, S., Seismann, H., McIntyre, M., Ollert, M., Wolf, S., Bantleon, F. I., & Spillner, E. (2013). Vitellogenins are new high molecular weight components and allergens (Api m 12 and Ves v 6) of *Apis mellifera* and *Vespula vulgaris* venom. *PloS one*, 8(4), e62009.

BenVau, L. R., & Nieh, J. C. (2017). Larval honey bees infected with *Nosema ceranae* have increased vitellogenin titers as young adults. *Scientific Reports*, 7, Article 14144.

Betten, D. P., Richardson, W. H., Tong, T. C., & Clark, R. F. (2006). Massive honey bee envenomation-induced rhabdomyolysis in an adolescent. *Pediatrics*, 117, 231-235.

BodlÁková, K., Beňová, M., & KodrÍk, D. (2018). The effect of adipokinetic hormones on the activity of digestive enzymes. *Physiological Entomology* 43, 140-148.

BodlÁková, K., Černý, J., Štěrbová, H., Guráň, R., Zítka, O., & KodrÍk, D. (2022). Insect body defence reactions against bee venom: Do adipokinetic hormones play a role? *Toxins*, 14(1), 11.

- Bogdanov, S. (2016). *Bee Venom: Production, Composition, Quality*. The Bee Venom Book. Muehlethurnen, Switzerland.
- Borzoui, E., Naseri, B., & Mohammadzadeh-Bidarani, M. (2016). Adaptation of *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae) to Rearing on *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) and *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Insect Science*, 16(1), 12.
- Calixto, M. C., Trichês, K. M., & Calixto, J. B. (2003). Analysis of the inflammatory response in the rat paw caused by the venom of *Apis mellifera* bee. *Inflammation Research*, 52(3), 132-139.
- Carol, N. V., Longley, R. W., & Roe, J. H. (1956). The determination of glycogen in liver and muscles by use of anthrone reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 220, 583-593.
- Casewell, N. R., Wüster, W., Vonk, F.J., Harrison, R. A., & Fry, B.G. (2013). Complex cocktails: The evolutionary novelty of venoms. *Trends in Ecology & Evolution*, 28(4), 219-229.
- Cohen, S., Gianaros, P. J., & Manuck, S. B. (2016). A Stage Model of Stress and Disease. *Perspectives on psychological science: a journal of the Association for Psychological Science*, 11(4), 456-463.
- Diederer, J. H., Oudejans, R. C., Harthoorn, L. F., & Van Der Horst, D. J. (2002). Cell biology of the adipokinetic hormone-producing neurosecretory cells in the locust corpus cardiacum. *Microscopy research and technique*, 56(3), 227-236.
- Dempsey, C. E. (1990). The actions of melittin on membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, 1031(2), 143-161.
- Drenth, D. (1974). Susceptibility of different species of insects to an extract of the venom gland of the wasp *Microbracon hebetor* (Say). *Toxicon*, 12(2), 189-192.

Even, N., Devaud, J. M., & Barron, A. B. (2012). General Stress Responses in the Honey Bee. *Insects*, 3(4), 1271-1298.

Ferreira Junior, R. S., Sciani, J. M., Marques-Porto, R., Junior, A. L., Orsi, R.deO., Barraviera, B., & Pimenta, D. C. (2010). Africanized honey bee (*Apis mellifera*) venom profiling: Seasonal variation of melittin and phospholipase A₂ levels. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 56(3), 355-362.

Fink, G. (2009). Stress: Definition and history. In *Encyclopedia of Neuroscience* (pp. 549-555). Elsevier.

Fletcher, J. E. & Jiang, M. S. (1993). Possible mechanisms of action of cobra snake venom cardiotoxins and bee venom melittin. *Toxicon*, 31(6), 669-695.

Florea, A., Varga, A. P., & Matei, H. V. (2018). Ultrastructural variability of mitochondrial cristae induced in vitro by bee (*Apis mellifera*) venom and its derivatives, melittin and phospholipase A₂, in isolated rat adrenocortical mitochondria. *Micron*, 112, 42-54.

Fox, J. W. & Serrano, S. M. T. (2007). Approaching the golden age of natural product pharmaceuticals from venom libraries: An overview of toxins and toxin-derivatives currently involved in therapeutic or diagnostic applications. *Curr. Pharm. Des.* 13 (28), 2927-2934.

Fry, B. G., Roelants, K., & Norman, J. A. (2009). Tentacles of venom: Toxic protein convergence in the kingdom *Animalia*. *Journal of Molecular Evolution*, 68(4), 311-321.

Gäde, G., Goldsworthy, G. J., Schaffer, M. H., Cook, J. C., & Rinehart, K. L. (1986). Sequence analyses of adipokinetic hormones-II from *corpora cardiaca* of *Schistocerca nitans*, *Schistocerca gregaria*, and *Locusta migratoria* by fast-atom-bombardment mass-spectrometry. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 134(2), 723-730.

Gäde, G. (1990). The adipokinetic hormone/red pigment-concentrating hormone peptide family: structures, interrelationships and functions. *Journal of insect physiology*, 36(1), 1-12.

Gruntenko, N. E., Adonyeva, N. V., Burdina, E. V., Karpova, E. K., Andreenkova, O. V., Gladkikh, D. V., Ilinsky, Y. Y., & Rauschenbach, I. Y. (2016). The impact of FOXO on dopamine and octopamine metabolism in *Drosophila* under normal and heat stress conditions. *Biology open*, 5(11), 1706-1711.

Habermann, E. (1972). Bee and wasp venoms. *Science*, 177, 314-322.

Hussain, F., ul Abdin, Z., Arif, M. J., Jamil, A., & Li, X. (2019). Isolation and characterization of immune suppressive genes through bioinformatic analysis of venom glands transcriptome of *Bracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae). *International Journal of Agriculture and Biology*, 21(6), 1189-1196.

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

Kini, R. M. (2017). Exploiting the therapeutic potential of venoms. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(12), 790-802.

Kodřík, D., Socha, R., Šimek, P., Zemek, R., & Goldsworthy, G.J. (2000). A new member of the AKH/RPCH family that stimulates locomotory activity in the firebug, *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30, 489-498.

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

Kodřík D. (2008) Review article: Adipokinetic hormone functions that are not associated with insect flight. *Physiol. Entomol.*, 33, 171-180.

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

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

Kodrík, D., Ibrahim, E., Gautam, U. K., Čapková Frydrychová, R., Bednářová, A., Křišťůfek, V., & Jedlička, P. (2019). Changes in vitellogenin expression caused by nematodal and fungal infections in insects. *The Journal of experimental biology*, 222(Pt 10), jeb202853.

Kodrík, D., Křišťůfek, V., & Svobodová, Z. (2022). Bee year: Basic physiological strategies to cope with seasonality. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 264, 111115.

Kodrík D., Čapková Frydrychová R., Hlávková D., Skoková Habuštová O. & Štěřbová H. (2023) Unusual functions of insect vitellogenins: *Minireview. Physiol. Res.* 7, S475-S487

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

Kumar, S., & Flatt, S. S. (2013). The Neuroendocrine Stress Response in Insects: Facts, Evidence and Persistent Unknowns. *Frontiers in Endocrinology*, 4, 123.

Kwon, Y. B., Lee, J. D., Lee, H. J., Han, H. J., Mar, W. C., Kang, S. K., & Beitz, A. J. (2002). Bee venom injection into an acupoint reduces arthritis associated edema and nociceptive responses. *Pain*, 90(3), 271-280.

Long, T. F., & Murdock, L. L. (2020). Biogenic amines and the regulation of stress-related behavior in insects. *General and Comparative Endocrinology*, 293, 113469.

Lubawy, J., Urbański, A., Mrówczyńska, L., Matuszewska, E., Światły-Błaszkiwicz, A., Matysiak, J., & Rosiński, G. (2019). The influence of bee venom melittin on the functioning of the immune system and the contractile activity of the insect heart—A preliminary study. *Toxins*, 11(9), 494.

Manzoor, A., UIAbdin, Z., Webb, B. A., Arif, M. J., & Jamil, A. (2016). De novo sequencing and transcriptome analysis of female venom glands of ectoparasitoid *Bracon hebetor* (Say.)

(Hymenoptera: Braconidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 20, 101-110.

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

Moreno, M., & Giralt, E. (2015). Three valuable peptides from bee and wasp venoms for therapeutic and biotechnological use: melittin, apamin and mastoparan. *Toxins*, 7(4), 1126-1150.

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

Mustard, J. A., Beggs, K. T., & Mercer, A. R. (2005). Molecular biology of the invertebrate dopamine receptors. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 59(2), 103-117.

Nguyen, C. D., Yoo, J., Hwang, S. Y., Cho, S. Y., Kim, M., Jang, H., No, K. O., Shin, J. C., Kim, J. H., & Lee, G. (2022). Bee Venom Activates the Nrf2/HO-1 and TrkB/CREB/BDNF Pathways in Neuronal Cell Responses against Oxidative Stress Induced by A β 1–42. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 1193.

Ownby, C. L., Powell, J. R., Jiang, M.-s., & Fletcher, J. E. (1997). Melittin and phospholipase A2 from bee (*Apis mellifera*) venom cause necrosis of murine skeletal muscle in vivo. *Toxicon*, 35(1), 67-80.

Ondřichová, A., Štěřbová, H., Danihlík, J., Jemelková, J., Hejníková, M., Šerý, M., & Kodřík, D. (2023). Physiological responses to honeybee venom poisoning in a model organism, the firebug *Pyrrhocoris apterus*. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology: CBP*, 270, 109657.

Owen, M. D., & Pfaff, L. A. (1995). Melittin synthesis in the venom system of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Toxicon*, 33(9), 1181-1188.

- Palm, N. W. (1993). Bee venom. *Chemistry & Biology*, 1(2), 83-90.
- Pandey, P., Khan, F., Khan, M. A., Kumar, R., & Upadhyay, T. K. (2023). An updated review summarizing the anticancer efficacy of melittin from bee venom in several models of human cancers. *Nutrients*, 15(14), 3111.
- Park, H. G., Lee, K. S., Kim, B. Y., Yoon, H. J., Choi, Y. S., Lee, K. Y., & Jin, B. R. (2018). Honeybee (*Apis cerana*) vitellogenin acts as an antimicrobial and antioxidant agent in the body and venom. *Developmental & Comparative Immunology*, 85, 51-60.
- Pennacchio, F., & Strand, M. R. (2006). Evolution of developmental strategies in parasitic Hymenoptera. *Annu. Rev. Entomol.*, 51, 233-258.
- Pennacchio, F., Caccia, S., & Digilio, M. C. (2014). Host regulation and nutritional exploitation by parasitic wasps. *Current Opinion in Insect Science*, 6, 74-79.
- Prokúpková N. (2022). *Obranné reakce hmyzu vůči intoxikaci: modelový druh včela medonosná*. Bakalářská práce (Bc.). Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. Přírodovědecká fakulta.
- Roeder, T. (1999). Octopamine in invertebrates. *Progress in Neurobiology*, 59(5), 533-561.
- Shaik, H. A., Mishra, A., & Kodrík, D. (2017). Beneficial effect of adipokinetic hormone on neuromuscular paralysis in insect body elicited by braconid wasp venom. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 196, 11-18.
- Shi, P., Xie, S., Yang, J., Zhang, Y., Han, S., Su, S., & Yao, H. (2022). Pharmacological effects and mechanisms of bee venom and its main components: Recent progress and perspective. *Frontiers in pharmacology*, 13, 1001553.
- Seehuus, S. C., Norberg, K., Gimsa, U., Krekling, T., & Amdam, G. V. (2006). Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(4), 962-967.

- Sláma, K., & Lukáš, J. (2011). Myogenic nature of insect heartbeat and intestinal peristalsis, revealed by neuromuscular paralysis caused by the sting of a braconid wasp. *Journal of insect physiology*, 57(2), 251–259.
- Socha, R., Šula, J., & Kodrík, D. (2004). Wing morph-related differences in developmental pattern of accessory gland proteins in adult males of *Pyrrhocoris apterus* (L.) and their endocrine control. *Journal of Insect Physiology*, 50, 893-900.
- Son, D. J., Lee, J. W., Lee, Y. H., Song, H. S., Lee, C. K., & Hong, J. T. (2007). Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. *Pharmacological Therapeutics*, 115(2), 246-270.
- Ueno, T., & Ueno, K. (2007). The effects of host-feeding on synovigenic egg development in an endoparasitic wasp, *Itoplectis naranyae*. *Journal of Insect Science*, 7(1), 46.
- Večeřa, J., Krishnan, N., Alquicer, G., Kodrík, D., & Socha, R. (2007). Adipokinetic hormone-induced enhancement of antioxidant capacity of *Pyrrhocoris apterus* hemolymph in response to oxidative stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 146(3), 336-342.
- Velki, M., Kodrík, D., Večeřa, J., Hackenberger, B. K., & Socha, R. (2011). Oxidative stress elicited by insecticides: a role for the adipokinetic hormone. *General and comparative endocrinology*, 172(1), 77-84.
- Vinokurov, K., Bednářová, A., Tomčala, A. Stašková, T., Krishnan, N., & Kodrík, D. (2014). Role of adipokinetic hormone in stimulation of salivary gland activities: The fire bug *Pyrrhocoris apterus* L. (Heteroptera) as a model species. *J. Insect Physiol.*, 60, 58-67.
- Weyda, F., & Kodrík, D. (2021). New functionally ultrastructural details of the honey bee stinger tip: serrated edge and pitted surface. *Journal of Apicultural Research*, 60(5), 875-878.
- Withers, P. C. (1977). Measurement of V_{O_2} , V_{CO_2} , and evaporative water loss with a flow-through mask. *Journal of Applied Physiology*, 42(1), 120-123.

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

Zöllner, N., & Kirch, K. (1962). Über die quantitative Bestimmung von Lipoiden (Mikromethode) mittels der vielen natürlichen Lipoiden (allen bekannten Plasmolipoiden) gemeinsamen Sulfo – phosphovanillin Reaktion. *Zeitschrift für die Gesamte Experimentelle Medizin* 135, 545-561.