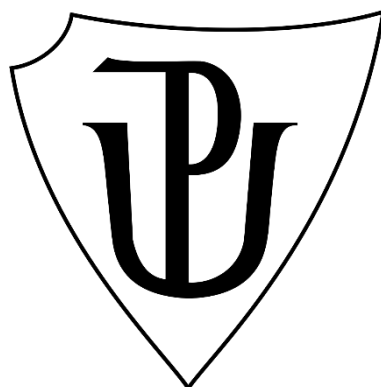


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Funkce thioredoxinů v antioxidačním systému hmyzu

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Andrea Gřešková
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	prof. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.
Rok:	2022

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

V Olomouci dne

.....
Podpis studenta

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu prof. Mgr. Markovi Petřivalskému, Dr. za odborné vedení, cenné rady, trpělivost a vstřícnost při zpracování mé bakalářské práce. Dále chci poděkovat členům Katedry biochemie za vytvoření příjemného prostředí pro práci v laboratoři.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Andrea Gřešková
Název práce	Funkce thioredoxinů v antioxidačním systému hmyzu
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	prof. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.
Rok obhajoby práce	2022

Abstrakt

Teoretická část této práce je zaměřena na antioxidační systém hmyzu. Je zde vysvětlen pojem oxidační stres, jeho vznik, účinky a faktory ovlivňující jeho působení u hmyzu. Dále jsou v práci popsány enzymy a neenzymové látky zajišťující antioxidační ochranu. V další části jsou shrnuty aktuální poznatky o thioredoxinovém systému u hmyzu se zaměřením na zástupce rodu *Apis*. Thioredoxinový systém se skládá z thioredoxinu, enzymu thioredoxinreduktasy a koenzymu NADPH. Hlavní úlohou thioredoxinového systému je antioxidační ochrana, podílí se ale i na jiných fyziologických procesech v organismu, a to v roli donorů elektronů pro další látky (např. pro enzym ribonukleotidreduktasu při syntéze DNA).

V experimentální části bakalářské práce byly testovány spektrofotometrické metody stanovení aktivity thioredoxinreduktasy v extraktu včely medonosné. Pro stanovení aktivity enzymu byly použity substráty DTNB, L-selenocystin a seleničitan sodný. Vhodnými metodami pro stanovení aktivity včelí thioredoxinreduktasy se jeví metoda s DTNB a seleničitanem sodným. Jako možné inhibitory thioredoxinreduktasy byly testovány látky methylviologen (pesticid paraquat) a auranofin, organická sloučenina obsahující zlato. Pro další optimalizaci metod by bylo výhodné použití purifikovaného enzymu.

Klíčová slova	Antioxidační systém, oxidační stres, thioredoxinreduktasa, thioredoxin, hmyz, včela medonosná
Počet stran	47
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Andrea Gřešková
Title	Functions of thioredoxins in insect antioxidant system
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Biochemistry
Supervisor	prof. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.
The year of presentation	2022

Abstract

The theoretical part of this thesis is focused on the antioxidant system of insects. The concept of oxidative stress, its origin, effects and factors influencing its actions in insects are explained there. Furthermore, enzymes and non-enzymatic substances providing antioxidant protection are described in the thesis. The next part summarises the current knowledge about the thioredoxin system in insects focusing on members of the genus *Apis*. The thioredoxin system consists of thioredoxin, the enzyme thioredoxin reductase and the coenzyme NADPH. The main role of the thioredoxin system is antioxidant protection, but it also participates in other physiological processes in the body, as in the role of electron donors for other substances (e.g. for the enzyme ribonucleotide reductase involved in DNA synthesis).

In the experimental part of the Bachelor thesis, spectrophotometric methods for thioredoxin reductase activity determination in honey bee extract were tested. Substrates as DTNB, L-selenocystine and sodium selenite were used to determine enzyme activity. DTNB and sodium selenite methods appear to be suitable methods for determining thioredoxin reductase activity. Methylviologen (pesticide paraquat) and auranofin, a gold-containing organic compound, were tested as possible thioredoxin reductase inhibitors. Both inhibitors show inhibitory effects on thioredoxin reductase activity. It would be advantageous to use a purified enzyme for the further optimization of the methods.

Keywords	Antioxidant system, oxidative stress, thioredoxin reductase, thioredoxin, insect, honey bee
Number of pages	47
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

1	Úvod	9
2	Současný stav řešené problematiky	10
2.1	Antioxidační systém hmyzu	10
2.1.1	Reaktivní formy kyslíku a dusíku	10
2.1.2	Oxidační stres u hmyzu	12
2.1.3	Neenzymová složka	12
2.1.3.1	Vitamin E	12
2.1.3.2	Vitamín C	13
2.1.3.3	Glutathion	14
2.1.3.4	Karotenoidy	14
2.1.3.5	Transferin a feritin	15
2.1.3.6	Vitelogenin	16
2.1.4	Enzymová složka	16
2.1.4.1	Superoxiddismutasy	16
2.1.4.2	Katalasy	17
2.1.4.3	GlutathionS–transferasy	18
2.1.4.4	Glutathionperoxidasy a reduktasy	18
2.1.4.5	Askorbátperoxidasy	19
2.1.4.6	Peroxiredoxiny - thioredoxinperoxidasy	19
2.1.4.7	Methioninsulfoxidreduktasy	20
2.2	Thioredoxinový systém hmyzu	21
2.2.1	Thioredoxin	21
2.2.2	Thioredoxinreduktasa	22
2.2.2.1	Mechanismus působení TrxR u <i>D. melanogaster</i>	23
2.2.3	Funkce za fyziologických a stresových podmínek	24
2.2.4	Thioredoxinový systém u včel (rod <i>Apis</i>)	26
2.2.5	Metody stanovení aktivity thioredoxinreduktas	27
3	Experimentální část	30
3.1	Chemikálie	30
3.2	Biologický materiál	30
3.3	Přístroje a vybavení	30
3.4	Metody	31
3.4.1	Příprava extraktu	31
3.4.2	Stanovení celkových proteinů metodou dle Bradforda	31
3.4.3	Stanovení aktivity TrxR po tepelné inaktivaci	31

3.4.4	Stanovení aktivity TrxR end-point metodou s DTNB v extraktu včely medonosné a octomilky obecné.....	32
3.4.5	Stanovení aktivity TrxR metodou s L-selenocystinem v extraktu včely medonosné.....	32
3.4.6	Stanovení aktivity TrxR metodou se seleničitanem sodným v extraktu včely medonosné.....	33
3.4.7	Zpracování výsledků.....	33
4	Výsledky a diskuze.....	34
4.1	Stanovení celkových proteinů metodou dle Bradforda	34
4.2	Stanovení aktivity TrxR po tepelné inaktivaci	34
4.3	Stanovení aktivity TrxR end-point metodou s DTNB v extraktu včely medonosné a octomilky obecné.....	35
4.4	Stanovení aktivity TrxR metodou s L-selenocystinem v extraktu včely medonosné.....	37
4.5	Stanovení aktivity TrxR metodou se seleničitanem sodným v extraktu včely medonosné.....	39
5	Závěr.....	41
6	Literatura	42
7	Seznam použitých zkratk	47

Cíle práce

- Vypracovat literární rešerši ohledně biologických funkcí thioredoxinového systému u hmyzu, včetně jejich genů, struktury, biosyntézy a funkce v antioxidačním systému a stresových odpovědích, se zaměřením na včelu medonosnou
- Vypracovat literární rešerši shrnující publikované metody pro stanovení aktivit thioredoxinreduktas
- Testovat a optimalizovat vybrané metody stanovení aktivity thioredoxinreduktasy ve vzorcích tkání včely medonosné

1 Úvod

Antioxidační systém se u aerobních organismů postupně vyvinul jako ochranný mechanismus proti zvyšujícímu se množství generovaných reaktivních forem kyslíku a dusíku. Tyto reaktivní formy jsou vedlejšími produkty aerobního metabolismu, podílejí se na buněčné signalizaci a imunitní obraně, ovšem při oxidačním stresu, tzn. zvýšení jejich hladiny nad antioxidační kapacitu, způsobují poškození hlavních buněčných komponent. Různé enzymové i neenzymové antioxidační mechanismy regulují hladinu reaktivních forem a hrají tak nezastupitelnou roli pro správné fungování organismu (Chaitanya et al., 2016).

Významné buněčné makromolekuly jako nukleové kyseliny, lipidy nebo proteiny mohou být interakcemi s reaktivními formami oxidovány a ztrácejí tak svou funkci. Určité aminokyseliny obsažené v proteinech jsou citlivější k oxidační modifikaci než jiné. Zvláštní význam má v tomto směru cystein. Thiolová skupina cysteinu může procházet reverzibilní oxidací, která ovlivňuje strukturu a funkci proteinu, což může vést až ke změnám v metabolické dráze, jejíž součástí je daný protein. Thioredoxinový systém se skládá z cílových proteinů obsahujících tyto thiolové skupiny – thioredoxinů a enzymu thioredoxinreduktasy, jejíž katalýza probíhá za účasti NADPH. Složky thioredoxinového systému působí v dithioldisulfidových výměnných reakcích a regulují tak metabolické dráhy v organismu. Slouží tedy především jako donor elektronů pro další enzymy antioxidačního systému a k regulaci proteinů v reakci na měnící se redoxní prostředí (Balsera & Buchanan, 2019).

Zatížení oxidačním stresem u hmyzu je různé, záleží na mnoha vnějších i vnitřních faktorech, ať už se jedná o vývojové stádium, způsob obživy, fyzická aktivita, citlivost na patogeny, čistota okolního prostředí či vystavení xenobiotikům. Včela medonosná je významný hmyzí opylovač zastupující důležitou roli v našem ekosystému. Řadí se mezi hmyz létavý a hlavně při sbírání pylu a nektaru je neustále vystavována stresovým podmínkám.

Thioredoxiny tvoří nezanedbatelnou část antioxidačního systému hmyzu. Pochopení antioxidačních mechanismů včel a jiného hmyzu může pomoci v jejich ochraně před stresovými faktory.

2 Současný stav řešené problematiky

2.1 Antioxidační systém hmyzu

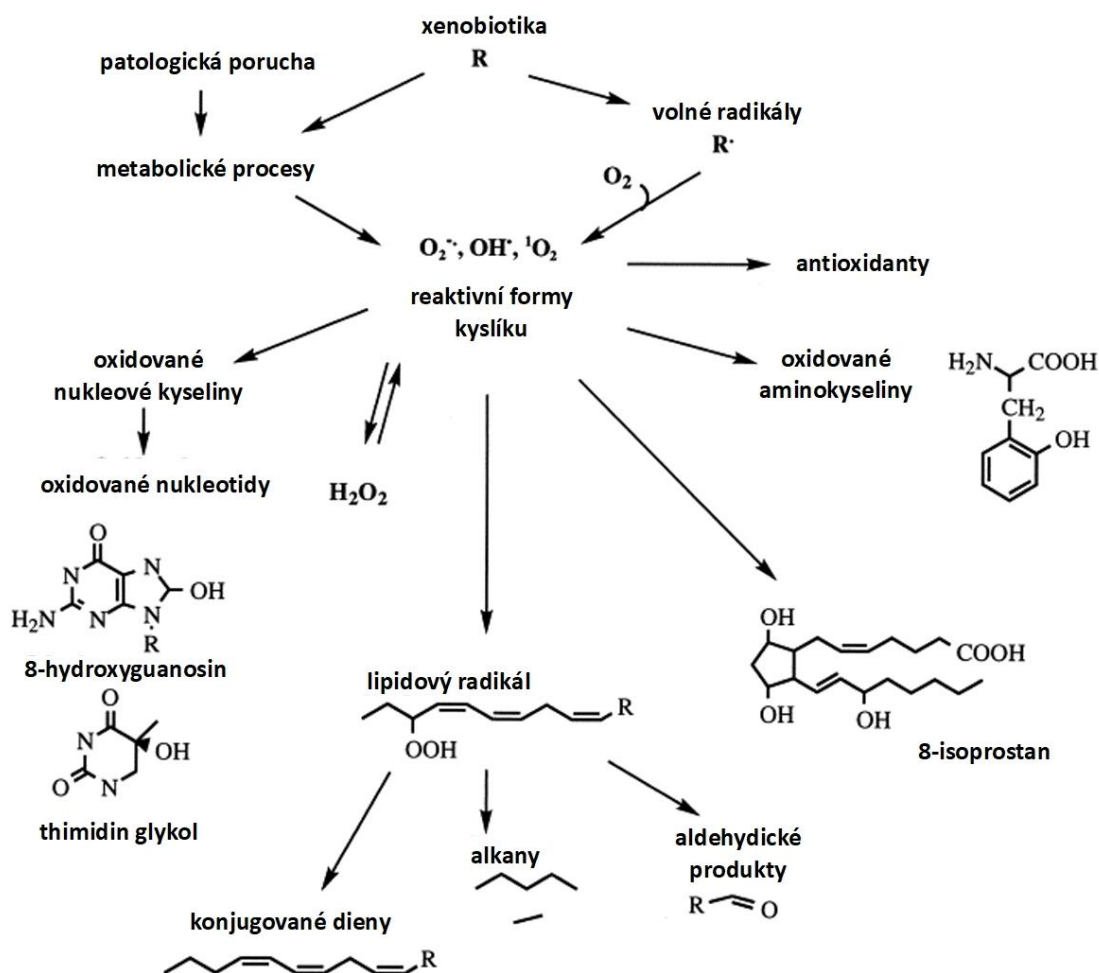
U organismů s aerobním metabolismem je udržován ustálený stav, tzv. homeostáza mezi reaktivními formami kyslíku (ROS) a dusíku (RNS) a antioxidanty (Farjan et al., 2015). Tato rovnováha je specifická pro každou organelu, přičemž jakékoli její narušení může být pro buňku a organismus škodlivé. Zvýšení množství ROS nad kapacitu antioxidantů je označováno jako oxidační stres a může vést k oxidačnímu poškození. Změna rovnováhy opačným směrem, tedy ke zvýšení redukční síly nebo antioxidantů, může také způsobit poškození a je definována jako redukční stres (Kohen & Nyska, 2002). Oxidační stres způsobuje disfunkci základních biomolekul: peroxidaci lipidů, narušení nukleových kyselin, modifikaci aminokyselin v proteinech a změně jejich biologické aktivity (Farjan et al., 2015). Destruktivní reakce ROS či RNS přispívá také k procesům stárnutí, karcinogenezi a buněčné smrti (Słowińska et al., 2016). S hrozbou oxidačního stresu se buňky vypořádávají pomocí antioxidačního systému, který se dále dělí na neenzymovou a enzymovou složku (Chaitanya et al., 2016).

2.1.1 Reaktivní formy kyslíku a dusíku

Mezi reaktivní formy kyslíku a dusíku patří volné radikály i neradikálové oxidanty (Monaghan et al., 2009). Volné radikály obsahují alespoň jeden nepárový elektron ve vnější elektronové vrstvě. Pro dosažení stability je tak nutné elektron odevzdat či přijmout, což má za následek jejich vysokou reaktivitu (Kohen & Nyska, 2002). Nejúčinnější a nejdůležitější volné radikály jsou v biologickém kontextu superoxidový anionradikál ($\bullet\text{O}_2^-$), hydroxylový radikál ($\bullet\text{OH}$) a oxid dusnatý (NO) jako zástupce RNS. Hlavními neradikálovými oxidanty jsou peroxid vodíku (H_2O_2), kyselina chlorná (HClO) a singletový kyslík ($^1\text{O}_2$). Jelikož RNS způsobují odlišné typy modifikací biomolekul než ROS (Monaghan et al., 2009), bude se tato práce dále zaměřovat jen na účinky ROS.

Asi 10 % celkového množství ROS je produkováno v živočišných buňkách záměrně a slouží k mnoha důležitým funkcím, např. buněčné signalizaci a transformaci či imunitní obraně. Zbýlých 90 % ROS vzniká jako vedlejší produkt metabolických procesů. V buňkách vyšších organismů se energie ukládá ve formě ATP generovaného v mitochondriích prostřednictvím elektronového transportního řetězce, přičemž více než 80 % veškerého kyslíku použitého buňkou je spotřebováno v tomto řetězci. Významné

biologické molekuly jako nukleové kyseliny, proteiny nebo lipidy mohou být ROS přímo ovlivněny a poškozeny (Obr. 1). Tyto reakce působí kaskádovitě, což vede ke vzniku více molekul ROS. Zvláště ohrožena je v tomto ohledu mitochondriální DNA, která se nachází v místě s vysokou tvorbou ROS (Monaghan et al., 2009). Po interakci s DNA může dojít k modifikaci dusíkových bází, rozpadu nukleotidových vláken či potlačení funkce opravných systémů nukleových kyselin (Kohen & Nyska, 2002). Nežádoucí je také oxidace proteinů, kdy se pozměňuje jejich struktura a tím i funkce v organismu. Narušeny mohou být jednotlivé aminokyseliny a sekundární či terciární struktury proteinů (Monaghan et al., 2009). Pro buňku je dále nebezpečné poškození membránových lipidů. Náchylnost lipidů k oxidaci radikály je dána počtem dvojných vazeb, u polynenasycených mastných kyselin je větší riziko oxidace než u nasycených a mononenasycených mastných kyselin (Hulbert et al., 2006).



Obr. 1 Schéma interakcí ROS s jinými biomolekulami. Převzato a upraveno od de Zwart et al., 1999

2.1.2 Oxidační stres u hmyzu

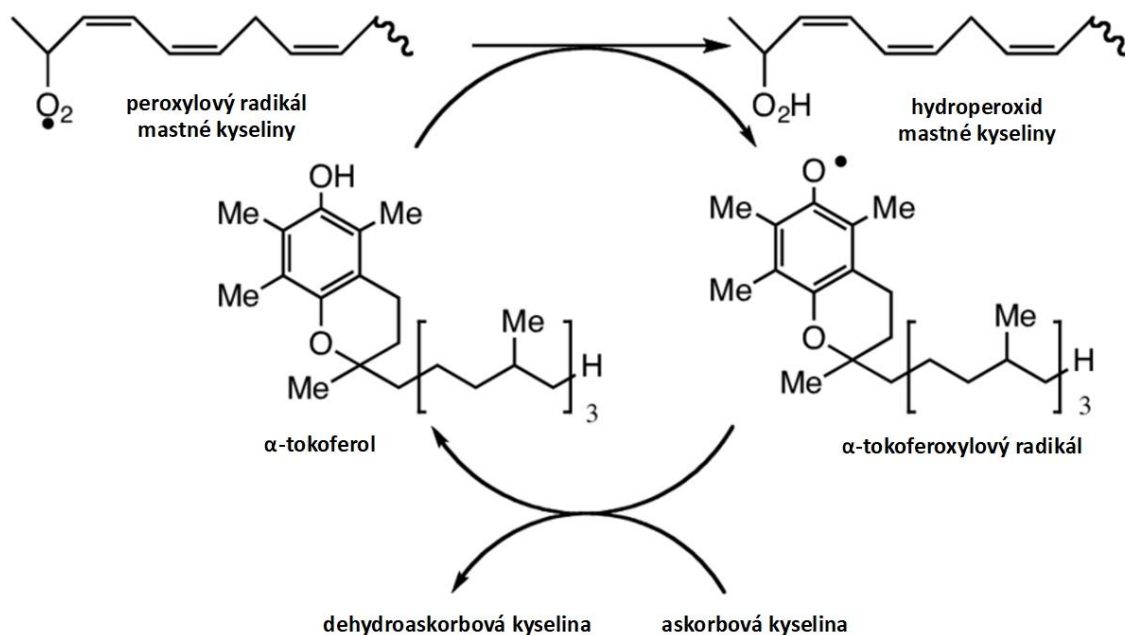
Úroveň oxidačního stresu u organismů není konstantní, ale mění se v závislosti na vývojovém stádiu, podmínkách prostředí a stupni aktivity (Monaghan et al., 2009). Hmyz je kvůli svému životnímu stylu více zatížen oxidačním stresem. Nejen že je O₂ transportován difúzí přímo z tracheálního systému do tkání, ale jeho spotřeba ve tkáni se navíc zvyšuje při náročnější fyzické aktivitě, např. letu (Korayem et al., 2012). Rychlost metabolismu létavek včely medonosné (*Apis mellifera*) se během letu zvyšuje 10 až 100 krát v porovnání s nelétavými dělnicemi, a proto je pro udržení homeostázy a zabránění oxidačnímu stresu potřeba větší antioxidační obrany (Williams et al., 2008). Zvýšená produkce ROS u hmyzu může být zapříčiněná i dalšími biologickými faktory, mezi něž patří sání krve a následný rozpad hemoglobinu, funkce mikrobiomu či oxidační vzplanutí hemocytů při ochraně proti patogenům. Pro prostředí, ve kterém jedinec žije, hraje také důležitou roli. Znečišťující látky v prostředí (kovy, polokovy) a některé organické sloučeniny vyvolávají generováním ROS oxidační stres. U býložravého hmyzu je vykazován stejný efekt působením některých fenolických látek vytvářených rostlinami v rámci rostlinných ochranných mechanismů. Oxidační účinky mají na hmyz také určité herbicidy a insekticidy (Chaitanya et al., 2016).

2.1.3 Neenzymová složka

Významnou roli v antioxidačním systému hrají u hmyzu nízkomolekulární látky, které reagují s ROS méně specificky a jsou tak univerzální ochranou organismu (Farjan et al., 2015). Mezi hlavní antioxidanty patří vitamín E (α -tokoferol), vitamín C (kyselina askorbová), karotenoidy, thioredoxin (popsán v kapitole 2.2.1) a glutathion (García-Caparrós et al., 2020; Słowińska et al., 2016). Podle Chaitanya et al. (2016) se kromě těchto látek na antioxidační ochraně podílejí taktéž proteiny vázající železo – feritin a transferin. U včel byla mimo to zjištěna antioxidační funkce proteinu vitelogeninu, prekursoru vaječného žloutku (Seehuus et al., 2006).

2.1.3.1 Vitamin E

Pojem vitamín E označuje souhrnně tokoferoly a tokotrienoly, látky rozpustné v tucích. Tokoferoly i tokotrienoly se vyskytují ve čtyřech izoformách: α , β , γ , a δ , přičemž největší antioxidační aktivitu vykazuje α -tokoferol. Role antioxidantu je významná pro obranu membránových lipidů. Volné radikály iniciují oxidaci nenasycených mastných kyselin za vzniku peroxylového radikálu mastné kyseliny, jež může další reakcí způsobit peroxidaci jiné mastné kyseliny. α -tokoferol vychytává



Obr. 2 Schéma antioxidačního působení α -tokoferolu. Převzato a upraveno od Haslam, 2001.

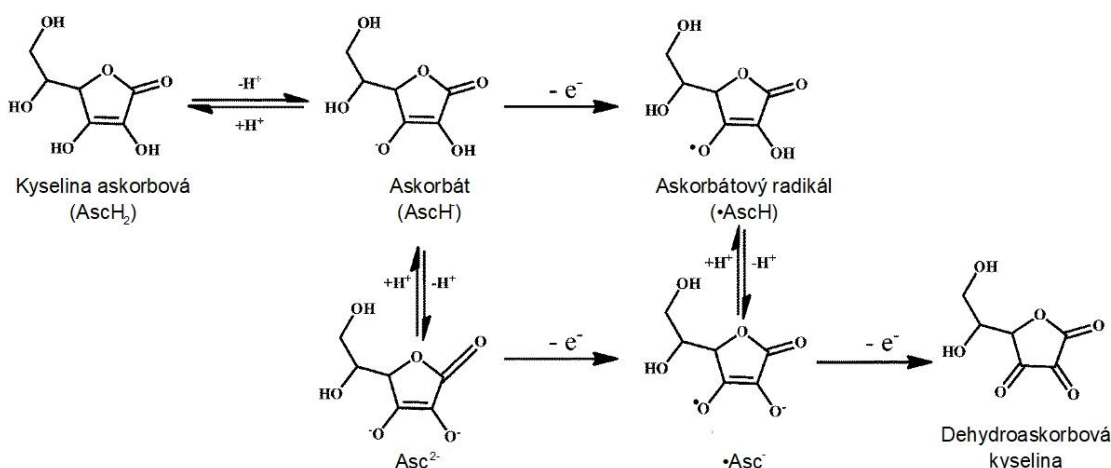
peroxylové radikály mastných kyselin a zabraňuje šíření řetězové reakce, protože vytvořený tokoferoxylový radikál je díky své struktuře relativně stabilní a tak i nereaktivní (Obr. 2). Regenerace tokoferoxylového radikálu do původní formy je zprostředkována kyselinou askorbovou či redukováným koenzymem Q (Niki, 2014).

Za podmínek oxidačního stresu byl u octomilky obecné (*Drosophila melanogaster*) po suplementaci vitamínem E zjištěn pozitivní vliv na délku života organismu, avšak při nestresových podmínkách nebyl tento efekt pozorován. Z toho vyplývá, že hlavní funkcí vitamínu E v *D. melanogaster* je podpora antioxidačního systému při stresových podmínkách (Bahadorani et al., 2008).

2.1.3.2 Vitamín C

Vitamín C neboli kyselina L-askorbová je ve vodě rozpustná látka, jež působí jako antioxidant či kofaktor enzymů. Většina živočichů včetně hmyzu není schopna její syntézy a musí ji přijímat v potravě. Antioxidační schopnost kyseliny askorbové spočívá v odevzdání elektronu volným radikálům, přičemž se vytvoří stabilní radikál kyseliny askorbové. Tento radikál může být oxidován na dehydroaskorbovou kyselinu (Obr. 3) nebo naopak redukován pomocí redukčních činidel GSH či NADH (Kohen & Nyska, 2002).

Podle Farjan et al. (2015) má kyselina askorbová podávaná jako doplněk stravy u včel příznivý vliv na celkový antioxidační status, díky čemuž byla mimo jiné zaznamenána snížená úmrtnost ve včelstvu během zimního období. Vysoká koncentrace



Obr. 3 Mechanismus antioxidačního působení kyseliny askorbové. Převzato a upraveno od Nimse & Pal, 2015.

vitamínu C ovšem může mít v přítomnosti železa opačný účinek. Redukční účinek kyseliny askorbové způsobuje přeměnu Fe^{3+} na Fe^{2+} , které může vystupovat jako katalyzátor Fentonovy reakce generující hydroxylové radikály z peroxidu vodíku či superoxidu (Bahadorani et al., 2008).

2.1.3.3 Glutathion

Glutathion je tripeptid skládající se z glutamátu, cysteinu a glycinu. Vyskytuje se ve dvou formách – redukované (GSH) a oxidované (GSSG). Oxidovaná forma vzniká spojením dvou molekul GSH přes –SH skupiny cysteinů za tvorby disulfidového můstku. V organismu je součástí mnoha metabolických drah, mimo jiné jako kofaktor enzymů. Glutathion plní také funkci významného antioxidantu, který přímo reaguje s ROS. GSSG může být převeden zpět do redukované formy za účasti glutathionreduktasy (GR) a NADPH (Kohen & Nyska, 2002). *D. melanogaster* a jiné druhy hmyzu ovšem ztratili gen pro GR, a proto byla funkce GR nahrazena thioredoxinovým systémem. V tomto případě je GSSG redukován na GSH pomocí proteinu thioredoxinu, který se tak oxiduje a je nazpět redukován v přítomnosti NADPH a enzymu thioredoxinreduktasy (Kanzok et al., 2001).

2.1.3.4 Karotenoidy

Karotenoidy se řadí do skupiny isoprenoidů osahujících ve své struktuře až 15 konjugovaných dvojných vazeb. Nejvýznamnějším zástupcem je β -karoten (von Lintig et al., 2021). Jejich oxidací vznikají retinoidy, deriváty retinolu (vitamín A). Retinoidy jsou u hmyzu nezbytné pro řadu biologických funkcí včetně zraku, reprodukce a reakce imunitního systému. Nízká hladina retinoidů u *D. melanogaster* může vést ke slepotě nebo vývojovým malformacím. Karotenoidy jsou syntetizovány rostlinami a některými

druhy bakterií a hub, hmyzem jsou získávány z potravy. Pro včely je důležitým zdrojem α - a β - karotenu právě pyl (Jumarie et al., 2017).

2.1.3.5 Transferin a feritin

Transferin a feritin jsou proteiny, které slouží k transportu a skladování železa (Dunkov & Georgieva, 2006). Železo je esenciálním prvkem pro živé organismy a je součástí široké škály metabolických procesů včetně transportu kyslíku, fixace dusíku, přenosu elektronů a syntézy DNA. Může mít ale také prooxidační účinek díky své schopnosti katalyzovat tvorbu volných radikálů, a to pomocí tzv. Fentonovy reakce, při které vzniká z peroxidu vodíku velmi reaktivní hydroxylový radikál za současné oxidace Fe^{2+} iontů na Fe^{3+} . Aby se zabránilo škodlivým účinkům železa, je železo vázáno na proteiny (Kim et al., 2008).

Transferin je monomerní protein pařící do rodiny proteinů vázajících železo (Dunkov & Georgieva, 2006). Transferin je přítomen především v séru, přičemž dvě třetiny sérového transferinu existují jako apotransferin, který dokáže rychle zachytit volné železo uvolněné z buněk. Hmyzí transferin působí jako transportní protein železa, antibiotické činidlo a vitelogenin protein přítomný ve vajíčku při tvorbě žloutku. Kromě toho se množství transferinu zvyšuje při stresové reakci na toxické jídlo, zranění a světlo (Kim et al., 2008). Analýza genomů anofeles gambijského (*Anopheles gambiae*), komára pisklavého (*Anopheles aegypti*), bource morušového (*Bombyx mori*) a *A. mellifera* odhalil, že tyto druhy mají geny kódující více proteinových homologů transferinu (Dunkov & Georgieva, 2006).

Feritiny jsou velké duté globulární proteiny, které mohou pojmout tisíce atomů železa ve formě nanočástic ferihydrátového minerálu (složen z opakujících se jednotek oxid-hydroxidu železitého). U většiny hmyzu je feritin hojně zastoupen v hemolymfě a sekrečních drahách buňky, méně pak v cytosolu nebo jádře. Hlavní funkcí feritinu je transport železa a jeho skladování, a to hlavně ve hmyzích vajíčkách. U *D. melanogaster* bylo prokázáno, že geny kódující feritin jsou výrazně více exprimovány při vystavení oxidačnímu stresu, což ukazuje na antioxidační roli těchto proteinů. Zvýšená hladina feritinu po krmení *A. aegypti* krví, zejména ve středním střevě, také naznačovala antioxidační funkci těchto proteinů, a to kvůli jejich zapojení v odstraňování přebytečného železa z natrávené krevní moučky (Dunkov & Georgieva, 2006).

2.1.3.6 Vitelogenin

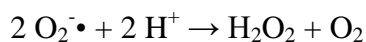
Protein vitelogenin se vyskytuje u živočichů kladoucí vejce jako je hmyz či ryby a ptáci, protože se jedná o prekurzor žloutkových proteinů. U hmyzu se kromě reprodukčních procesů podílí i na imunitní obraně, délce života a antioxidační ochraně. Vyšší množství vitelogeninu bylo zaznamenáno u včelích dělnic a královen, kde je spojováno s větší odolností vůči oxidačnímu stresu a tím i s prodloužením délky života (Park et al., 2018). Antioxidační funkce vitelogeninu byla prokázána v tukové tkáni *A. mellifera* (Seehuus et al., 2006) a tukové tkáni i jedu včely východní (*Apis cerana*) (Park et al., 2018).

2.1.4 Enzymová složka

Antioxidační enzymy lze rozdělit do dvou skupin na primární a sekundární. Primární enzymy reagují přímo s ROS a patří mezi ně superoxiddismutasa (SOD), katalasa a peroxidasy. K sekundárním enzymům, které se podílí na přenosu elektronů z redukovaných kofaktorů v katabolismu ROS, se řadí thioredoxinreduktasa, glutathionreduktasa a methioninsulfoxidreduktasa (Corona & Robinson, 2006). Thioredoxinreduktasami se zabývá kapitola 2.2.2, proto zde nejsou více rozebrány.

2.1.4.1 Superoxiddismutasy (EC 1. 15. 1. 1)

Superoxiddismutasy (SOD) katalyzují dismutaci superoxidových anionradikálů na kyslík a peroxid vodíku podle rovnice:

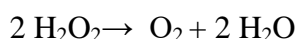


Peroxid vodíku je dále odstraňován pomocí katalasy či peroxidasy (Kohen & Nyska, 2002). SOD se u živočichů vyskytují ve dvou formách odlišujících se v buněčné lokalizaci a struktuře aktivního místa – Cu/ZnSOD (SOD1) se nachází v cytoplazmě a MnSOD (SOD2) v matrix mitochondrií. U mnoha druhů živočichů včetně hmyzu byly identifikovány extracelulární Cu/ZnSOD, přesněji u zástupců *D. melanogaster*, *A. mellifera*, *A. gambiae* a mravenec obecný (*Lasius niger*) (Corona & Robinson, 2006). Skupina genů pro Cu/ZnSOD zahrnuje pět členů u *D. melanogaster* a *A. gambiae* a čtyři členy u *A. mellifera*. U *D. melanogaster* se jedná o geny pro cytoplasmatickou Cu/ZnSOD, extracelulární SOD (*Sod3*), chaperon obsahující měď (CCS), gen související se SOD (*Rsd* – Related to Sod) a Sodesque (*Sodq*) (Corona & Robinson, 2006). Homolog genu *Sodq* byl nalezen také u *A. gambiae* a zdá se, že se rodina těchto genů vyvinula u hmyzu a je zachována pouze u dvoukřídlých (Landis & Tower, 2005).

Podle obecné hypotézy přispívá oxidační stres a oxidační poškození buněk ke stárnutí organismu. Bylo zjištěno, že omezení aktivity SOD u *D. melanogaster* (např. prostřednictvím mutace) snižuje odolnost vůči oxidačnímu stresu a délku života (Duttaroy et al., 2003), zatímco nadměrná exprese SOD může zvýšit odolnost vůči stresu a prodloužit délku života (Sun et al., 2004). Avšak jiné studie argumentují proti teorii o jednoduché korelaci mezi aktivitou SOD a stárnutím (Landis & Tower, 2005). U dlouhověkých organismů jako jsou mravenčí královny *L. niger*, dožívající se věku až 28 let, byla zjištěna snížená exprese genu pro SOD1 v porovnání s dělnicemi (délka života 1-2 roky) a samci (délka života několik týdnů), což podporuje tvrzení, že zvýšená exprese *SOD1* přímo nesouvisí s prodloužením života organismu (Parker et al., 2004). Podobné závěry uvádějí i experimenty prováděné na jiných druzích živočichů, např. háďátko obecné (*Caenorhabditis elegans*) či myš domácí (*Mus musculus*).

2.1.4.2 Katalasy (EC 1.11.1.6)

Enzym katalasa (CAT) katalyzuje přeměnu dvou molekul peroxidu vodíku na vodu a kyslík a zabraňuje tak vzniku hydroxylových radikálů (Corona & Robinson, 2006):



Kvůli vysoké hodnotě K_m je ovšem CAT méně efektivní při odstraňování menšího množství H_2O_2 a pokud se nevyskytuje ve velké koncentraci, není možné jejím prostřednictvím uspokojivě snížit hladinu H_2O_2 (Korayem et al., 2012).

Katalasa je nejvíce koncentrovaná v peroxisomech a mitochondriích, organelách s nejvyšším výskytem peroxidu vodíku. Po fyzické zátěži by proto ve svalech s vysokým obsahem mitochondrií měla být zvýšená její aktivita, ale několik studií na různých organismech ukázalo v tomto ohledu vysokou variabilitu, což může být částečně vysvětleno rozdílnou citlivostí tkání a metodologií (Williams et al., 2008). Podle studie Williams et al. (2008) se u létavek včely medonosné hladina CAT ve svalech během denního opylování podstatně zvýšila, a tudíž ji lze, alespoň u včel, považovat za jeden z hlavních přispěvatelů k antioxidační obraně. Přítomnost CAT byla zaznamenána i ve spermatu trubců a spermatékách již spářených včelích královen. Zvýšená aktivita CAT je ve spermatékách, které slouží k uchování spermatu samičkami, pravděpodobně kvůli zajištění ochrany spermií před externím peroxidem (Weirich et al., 2002). Aktivita katalasy byla zjištěna také ve včelím medu, ovšem jedná se o katalasu rostlinného původu. Důvodem přítomnosti katalasy je rozklad peroxidu

vodíku, který zde vzniká při oxidaci glukosy katalyzované enzymem glukosaoxidasou. Peroxid vodíku působí v medu jako jedno z hlavních antimikrobiálních činidel (Bruzynski, 2020).

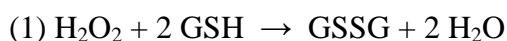
2.1.4.3 GlutathionS–transferasy (EC 2.5.1.18)

Hmyzí glutathionS–transferasy (GST) jsou velkou rodinou multifunkčních enzymů, které jsou klasifikovány na základě jejich umístění v buňce na cytosolové a mikrosomální. Cytosolové GST byly rozděleny do šesti hlavních podtříd: delta, epsilon, omega, sigma, theta a zeta, přičemž podtřídy delta a epsilon jsou pro hmyz specifické (Sun et al., 2020). Hlavní funkcí GST je detoxikace xenobiotických sloučenin, dále hrají roli v intracelulárním transportu, biosyntéze hormonů a ochraně proti oxidačnímu stresu, přesněji proti peroxidačnímu poškození (Corona & Robinson, 2006; Sun et al., 2020). Zejména sigma GST mají významnou úlohu v antioxidační obraně (Sun et al., 2020).

U *D. melanogaster*, *A. gambiae* a *A. mellifera* bylo identifikováno 40, 35 a 11 cytosolových GST, zatímco mikrosomálních GST pouze tři u *D. melanogaster*, tři u *A. gambiae* a dvě u *A. mellifera*. Specifické podtřídy delta a epsilon byly nejvíce zastoupeny u *D. melanogaster* i *A. gambiae*, ovšem u *A. mellifera* se nejvíce vyskytovala sigma GST. Delta a epsilon GST jsou jediné dvě třídy, u kterých se předpokládá, že ovlivňují citlivost na pesticidy. Pravděpodobným vysvětlením tedy je, že dvě delta GST přítomné u *A. mellifera* působí jako důležité obranné mechanismy proti účinkům endogenních xenobiotik (Shi et al., 2012). Naopak rozšíření třídy sigma u včel souvisí spíše s ochranou proti oxidantům produkovaným aerobním metabolismem než proti vlivu xenobiotik (Corona & Robinson, 2006).

2.1.4.4 Glutathionperoxidasy a reduktasy (EC 1.11.1.9, EC 1.8.1.7)

Glutathionperoxidasy (GPx) jsou skupinou enzymů katalyzujících redukci peroxidu vodíku nebo organických hydroperoxidů na vodu či jejich příslušné alkoholy s využitím redukovaného glutathionu (1) a plní tak podstatnou funkci v antioxidačním systému (Margis et al., 2008; Dias et al., 2016). Glutathionreduktasy (GR) katalyzují redukci GSSG na GSH (2), čímž udržují vysokou koncentraci redukované formy glutathionu (Kanzok et al., 2001).



Podle Corona & Robinson (2006) ovšem došlo u hmyzu ke ztrátě genů kódujících glutathionperoxidasu a glutathionreduktasu. U *A. mellifera*, *A. gambiae* i *D. melanogaster* byly popsány dva homologní geny s thioredoxinreduktasovou aktivitou (GPTx) – vykazují vyšší afinitu k thioredoxinům, které používají jako donor elektronů místo glutathionu (Corona & Robinson, 2006; Dias et al., 2016). Zdá se, že specifičnost pro thioredoxin nebo glutathion souvisí se strukturou aktivního místa enzymu. Glutathionperoxidasy obsahující v aktivním místě selenocystein mají větší specifitu pro glutathion, zatímco jiné obsahující cystein preferují jako donor elektronů thioredoxin. Struktura těchto GPx zahrnuje dvě redoxní centra s cysteinovými zbytky, které tvoří při katalýze disulfidovou vazbu (Dias et al., 2016).

2.1.4.5 Askorbátperoxidasy (EC 1.11.1.11)

Askorbátperoxidasy (APx) jsou enzymy odpovědné za redukci peroxidu vodíku pomocí kyseliny askorbové jako donoru elektronů (García-Caparrós et al., 2020).



U hmyzu, narozdíl od rostlin, zatím nebyla jednoznačně prokázána přítomnost APx na úrovni genu ani proteinu, popisované aktivity tedy mohou vykazovat i jiné enzymy z řad peroxidas využívající stejné substráty.

APx jsou účinné při odstraňování nízkých koncentrací peroxidu vodíku, které nemohou být vychytávány pomocí katalasy z důvodu její nízké hodnoty K_m (Krishnan & Kodrík, 2006). Toto tvrzení podporují i zjištěné korelace mezi aktivitami SOD, CAT a APx, kdy byla zjištěna zvýšená aktivita těchto enzymů při oxidačním stresu u *A. mellifera*. Navíc je poukazováno na možnou další funkci APx mimo redukce H_2O_2 , a to reakci s jinými peroxidy či hydroperoxidy (Korayem et al., 2012).

2.1.4.6 Peroxiredoxiny – thioredoxinperoxidasy (EC 1.11.1.24)

Thioredoxinperoxidasy (TPx), nazývané též peroxiredoxiny, jsou rodinou peroxidas na bázi cysteinu eliminující H_2O_2 a organické hydroperoxidy (Cao et al., 2018). TPx katalyzují redukci H_2O_2 na H_2O s využitím Trx. Touto reakcí ovlivňují redoxní signalizaci zprostředkovanou H_2O_2 i další interakce Trx s cílovými molekulami (Matsuzawa, 2017). Na základě počtu aktivních Cys zbytků v proteinových sekvencích jsou TPx klasifikovány do dvou podrodin: 1-Cys a 2-Cys. Na rozdíl od 1-Cys enzymů mají 2-Cys proteiny další Cys zbytek v C-terminální oblasti. Skupina 2-Cys se dále dělí

podle strukturních znaků a biochemických vlastností na typické a atypické enzymy (Cao et al., 2018).

V genomu *D. melanogaster* bylo identifikováno pět genů pro TPx, které kódují tři odlišné typy TPx – cytosolické, mitochondriální a sekretovatelné (Hu et al., 2010). Nalezeno bylo také pět homologních genů pro TPx u *A. gambiae* i *A. mellifera*, ovšem zdá se, že u *A. mellifera* byl ztracen gen pro sekretovatelný typ TPx na rozdíl od dalších zástupců dvoukřídlého hmyzu (Corona & Robinson, 2006). Důležitost TPx v ochraně proti stresu byla ukázána v mnoha studiích zabývajících se různými druhy hmyzu. Stresovým podmínkám jako jsou teplotní změny, působení insekticidů či virová infekce byly vystaveny např. *B. mori* nebo *A. cerana*, přičemž u obou došlo ke zvýšení exprese genů pro TPx. Umlčení těchto genů vedlo u blyškovky (*Spodoptera spp.*) či kyjatky hrachové (*Acyrtosiphon pisum*) naopak k rychlejšímu úmrtí po houbové a virové infekci (Cao et al., 2018).

2.1.4.7 Methioninsulfoxidreduktasy (EC 1.8.4.13)

Methioninsulfoxidreduktasy (Msr) katalyzují reakci, při které dochází k redukci methionin sulfoxidu na methionin a mohou tak zvrátit poškození proteinů způsobené oxidací methioninových skupin. V tomto procesu mohou methioninové zbytky v proteinech fungovat jako katalytické antioxidanty, protože s každou oxidací methioninového zbytku pomocí ROS a redukcí methionin sulfoxidu enzymem Msr je odstraněn jeden ekvivalent ROS. Další potenciálně důležitou úlohou Msr je regulace aktivity proteinu. Funkce iontových kanálů v buněčné membráně se může měnit v závislosti na oxidačním/redukčním stavu methioninových zbytků (Zhang & Weissbach, 2008).

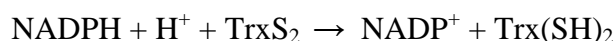
Msr se vyskytují ve dvou různých formách a každá z nich redukuje jeden z epimerů methionin sulfoxidu, methionin-S-sulfoxid reduktasa (MsrA) a methionin-R-sulfoxid reduktasa (MsrB). U *A. mellifera*, *A. gambiae* i *D. melanogaster* byl identifikován jeden gen pro každý z těchto enzymů (Corona & Robinson, 2006).

2.2 Thioredoxinový systém hmyzu

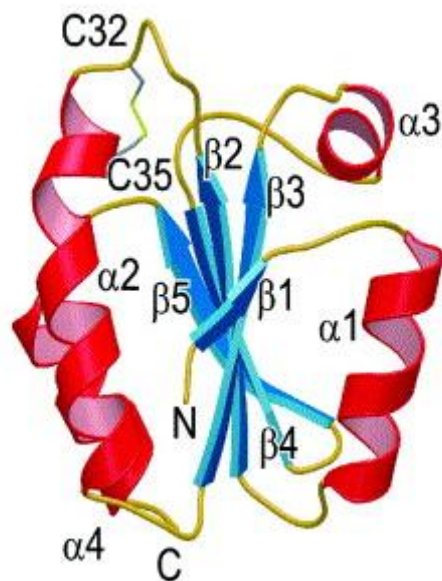
Thioredoxinový systém se vyvinul u organismů napříč všemi evolučními stupni (Koháryová & Kollárová, 2015). Obsahuje thioredoxin (Trx), enzym thioredoxinreduktasu (TrxR) a koenzym NADPH a je hlavním disulfidreduktasovým systémem, který může poskytnout elektrony velkému spektru dalších enzymů (Lu & Holmgren, 2014). Trx systém hraje důležitou roli v mnoha fyziologických procesech a je také významným buněčným antioxidačním mechanismem – chrání buňky před poškozením způsobeným oxidačním stresem, vylučuje ROS a řídí buněčnou redoxní rovnováhu. Pro mnoho organismů je jeho přítomnost nezbytná pro život. U vyšších organismů se složky Trx systému nacházejí v jádře, cytoplasmě, chloroplastech či mitochondriích, dále se mohou vyskytovat extracelulárně nebo vázané na membránu (Koháryová & Kollárová, 2015).

2.2.1 Thioredoxin

Thioredoxiny (Trx) jsou malé thiolové proteiny s molekulovou hmotností asi 12 kDa, které jsou přítomny ve všech dosud studovaných organismech. Rodina Trx zahrnuje cytosolický Trx (Trx1), mitochondriální Trx (Trx2) a izoformu Trx specifickou pro spermatidy (Sp-Trx3) (Matsuzawa, 2017). Trx obsahuje ve své struktuře pět β -skládaných listů tvořících vnitřní jádro proteinu a čtyři α -helixy, které obklopují centrální β -listy. Aktivní místo s typickým motivem Cys³²-Gly-Pro-Cys³⁵ se nachází mezi β 2 vláknem a α 2 helixem, přesněji na N-konci α 2 helixu (Obr. 4) (Wahl et al., 2005). Mnoho klíčových enzymů antioxidačního systému závislých na thiolu má tuto Trx strukturu, např. peroxiredoxin (thioredoxinperoxidasa) a glutathionperoxidasa (Lu & Holmgren, 2014). Redukce proteinového disulfidu (TrxS₂) na dithiolovou formu (Trx(SH)₂) je katalyzována NADPH dependentním flavoenzymem thioredoxinreduktasou (Bauer et al., 2002):



Trx je potřebný pro velký počet buněčných funkcí. Tyto proteiny mají důležitou roli v syntéze DNA jako donory elektronů pro ribonukleotidreduktasu a podílejí se na buněčné odpovědi na oxidační stres. Četné disulfidové vazby účastnící se skládání proteinů nebo redoxní kontroly transkripce jsou účinně a selektivně redukovány právě thioredoxiny (Bauer et al., 2002). U hmyzu je z důvodu ztráty genů pro GR možná také neenzymová redukce GSSG na GSH pomocí aktivního Trx (Bauer et al., 2003).

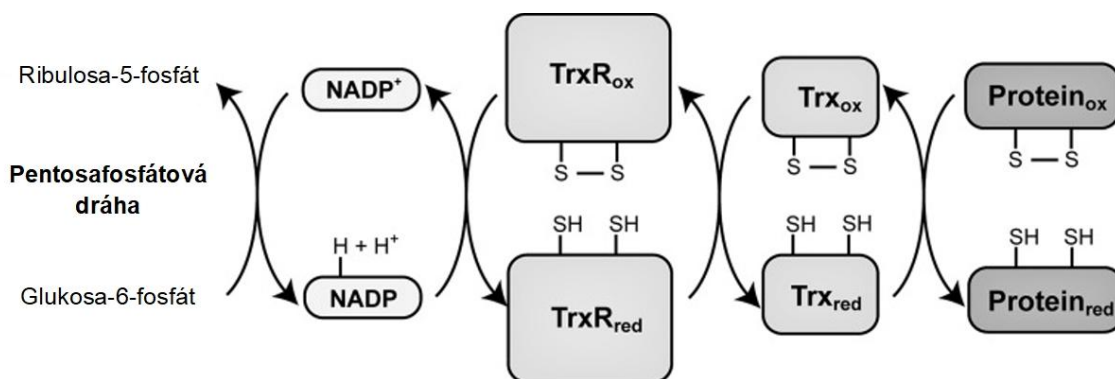


Obr. 4 Struktura oxidovaného DmTrx-2; α -helixy označeny červeně, β -listy modře, disulfid v aktivním místě (C32 a C35) vyobrazen tyčinkami. Převzato od Wahl et al., 2005.

U *D. melanogaster* byly charakterizovány tři geny kódující Trx – DmTrx-1, DmTrx-2 a DmTrxT, spolu s dalšími čtyřmi geny pro thioredoxin podobné proteiny (Trx-like). DmTrx-1 a DmTrxT jsou lokalizovány v jádře, zatímco DmTrx-2 se nachází v cytosolu (Corona & Robinson, 2006). Bauer et al. (2002) prokázali, že pravým substrátem pro TPx u *D. melanogaster* je právě DmTrx-2 a nikoliv DmTrx-1, jak bylo usuzováno. Tato fakta ukazují na hlavní roli DmTrx-2 v udržování redoxní rovnováhy v buňce. Rozdílná situace nastává při redukci glutathionu, která je zprostředkovávána stejnou měrou DmTrx-1 i DmTrx-2. *A. gambiae* i *A. mellifera* obsahují tři geny kódující homologní Trx k těm u *D. melanogaster*.

2.2.2 Thioredoxinreduktasa (EC 1.8.1.9)

Thioredoxinreduktasy (TrxR) jsou homodimerní flavoproteiny patřící mezi oxidoreduktasy s obsaženým disulfidem. TrxR slouží v organismu k udržování thioredoxinu v jeho redukovaném stavu. Katalyzují přenos elektronů z NADPH na oxidovaný Trx, který následně ve své aktivní redukované formě interaguje s dalšími molekulami (Obr. 5) (Balseira & Buchanan, 2019). Rozlišují se dvě třídy TrxR – s nízkou M_r (35 kDa pro každou podjednotku) a s vysokou M_r (55 kDa pro každou podjednotku). V eukaryotních organismech je přítomna TrxR s vysokou M_r (Lu & Holmgren, 2014). Každý monomer TrxR s vysokou M_r obsahuje tři domény: doménu vázající FAD, doménu vázající NADPH a doménu, která poskytuje rozhraní mezi oběma monomery. Na obou monomerech se nachází aktivní místa sestávající z FAD,



Obr. 5 Schéma kaskádového působení thioredoxinového systému. Převzato a upraveno od Lee et al., 2013.

N-terminálního redoxního disulfidu a C-terminálního redoxního disulfidu. TrxR s nízkou Mr postrádají C-terminální disulfid a mají tak pouze dvě aktivní místa. (Bauer et al., 2003).

Savčí TrxR jsou charakteristické C-koncovou sekvencí Gly-Cys-Sec-Gly-OH, která se zapojuje do redukce Trx. Tento motiv odlišuje TrxR od jiných strukturně a funkčně blízké příbuzných flavoproteinových oxidoreduktas obsahujících disulfid jako jsou lipoamiddehydrogenasa a feredoxinreduktasa (Corona & Robinson, 2006). U *D. melanogaster* je Sec v této koncové části TrxR nahrazen Cys a sekvence má podobu Ser-Cys-Cys-Ser. Tato záměna Sec za Cys je předpokládána i u *A. gambiae* a může tak představovat společný znak pro dvoukřídlý hmyz (Kanzok et al., 2001). Nahrazení katalytického Sec v savčím enzymu za Cys má za následek velký pokles katalytické aktivity, ale DmTrxR (TrxR z *D. melanogaster*) postrádající Sec má vysokou aktivitu vůči příbuzným formám Trx, což dokazuje, že přítomnost zbytku Sec není nutná ke katalýze redukce disulfidové vazby v Trx. Možné vysvětlení je blízká přítomnost Ser v C-koncové sekvenci DmTrxR, který přispívá k reaktivitě disulfidu (Eckenroth et al., 2007).

Na rozdíl od *D. melanogaster*, která má dva geny pro TrxR, u *A. mellifera* a *A. gambiae* byl zjištěn gen pouze jeden. Geny identifikované u *D. melanogaster* a *A. gambiae* kódovaly tři formy TrxR, jednu mitochondriální a dvě cytoplazmatické, zatímco u *A. mellifera* nebyla mitochondriální forma potvrzena (Corona & Robinson, 2006).

2.2.2.1 Mechanismus působení TrxR u *D. melanogaster*

Jak již bylo zmíněno výše, aktivní místo na každém monomeru TrxR obsahuje kofaktor FAD a dva redoxní disulfidy, přičemž C-koncový disulfid je součástí peptidového

řetězce opačného monomeru než N-koncový disulfid a FAD. V TrxR u *D. melanogaster* je C-koncový disulfid jednoho aktivního místa složen z Cys⁴⁸⁹ a Cys⁴⁹⁰, a N-koncový disulfid z Cys⁵⁷ a Cys⁶², druhé aktivní místo tvoří C-koncový Cys⁴⁸⁹ a Cys⁴⁹⁰ a N-koncový Cys⁵⁷ a Cys⁶² (Bauer et al., 2003). Na N-konci je v aktivním místě připojen také histidinový zbytek (His⁴⁶⁴ u *D. melanogaster*), který působí jako acidobazický katalyzátor při reakci dithiol-disulfid (Huang et al., 2008).

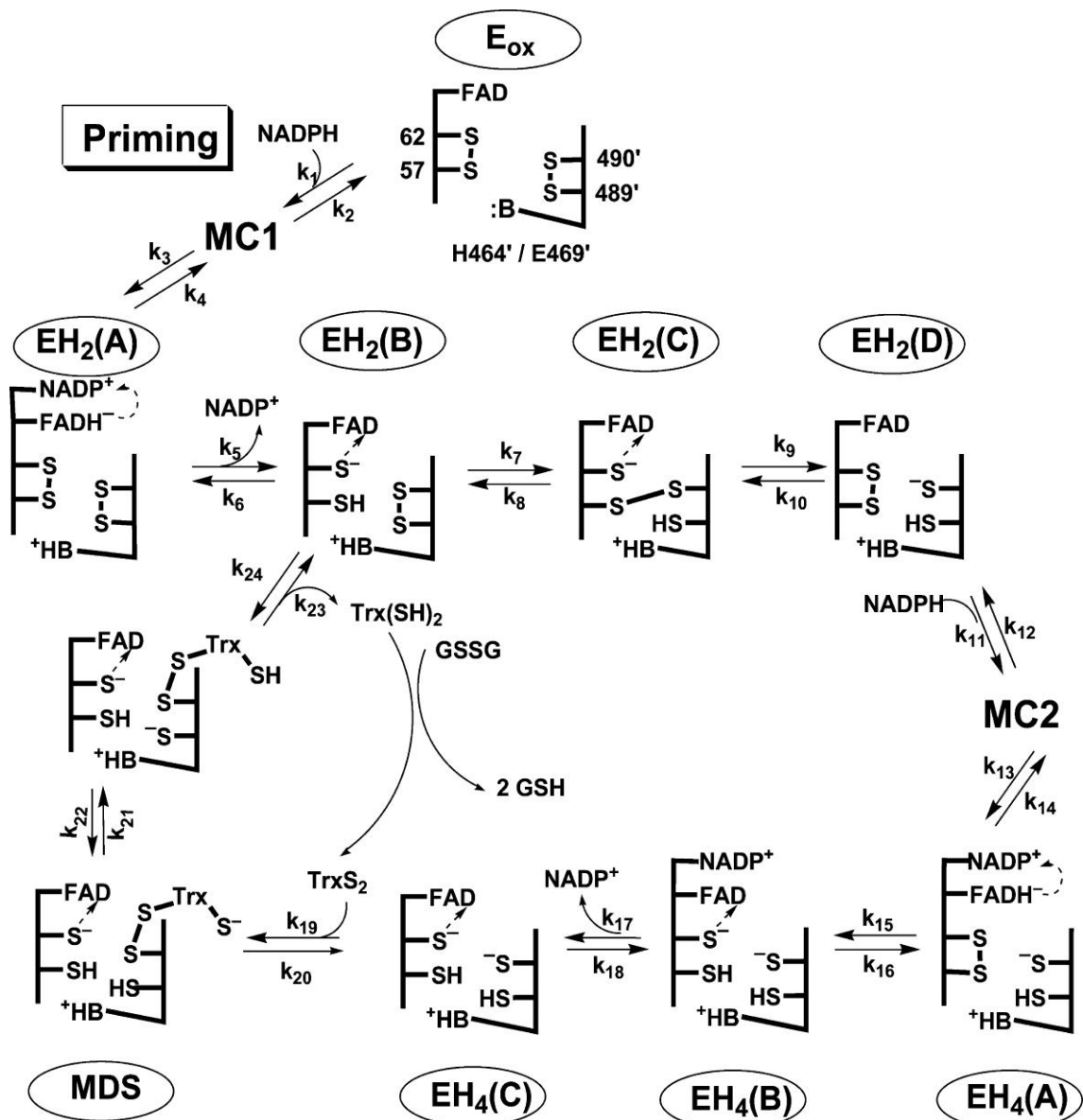
Na Obr. 6 je zobrazen mechanismus katalýzy DmTrxR. FAD vázané na enzym interaguje s NADPH za tvorby komplexu enzym-substrát (Michaelisův komplex), ze kterého dále vzniká směs čtyř rovnovážných forem redukovaných dvěma elektrony (EH₂ A-D). Elektrony jsou předávány mezi FAD, N-koncovým disulfidem a C-koncovým disulfidem. Po přidání dalšího ekvivalentu NADPH je vytvořen druhý Michaelisův komplex a následně tři rovnovážné formy redukované čtyřmi elektrony (EH₄ A-C). Navázáním oxidovaného Trx (TrxS₂) začíná další fáze reakce vedoucí ke tvorbě smíšeného disulfidu, na jejímž konci se uvolní redukovaný Trx (Trx(SH)₂). DmTrxR se dostává do stavu EH₂ B, kdy může začít další cyklus katalýzy (Bauer et al., 2003; Huang et al., 2008).

Předpokládá se, že přímou interakci s thio-redoxinovým disulfidem zajišťuje C-koncový Cys⁴⁹⁰, který zaujímá stejnou pozici jako Sec plnící tuto funkci v savčí TrxR. Cys⁴⁹⁰ by tak zprostředkoval jednak přenos elektronů z N-koncového Cys⁵⁷ na C-koncový disulfid, a zároveň i redukci Trx (Bauer et al., 2003).

2.2.3 Funkce za fyziologických a stresových podmínek

Thio-redoxinový systém je u hmyzu důležitým disulfidreduktasovým systémem. Redoxní prvky, jako jsou Cys zbytky proteinů citlivé na oxidační modifikace, se účastní různých buněčných signálních drah prostřednictvím interakcí s dalšími proteiny. Funkce Trx systému tak může ovlivňovat hlavní metabolické děje v organismu (Balsera & Buchanan, 2019). Základní úlohou Trx systému je poskytovat redukční ekvivalenty a chránit buňku před škodlivými účinky oxidačního stresu, který nakonec může vést až k apoptóze.

Jakékoli význačné změny v aktivitě Trx a aktivitě redukčních enzymů, které jsou při regeneraci svých redukčních schopností závislé na Trx, nakonec povedou ke zvýšenému množství oxidovaných proteinů. Hlavní enzymy v tomto ohledu závislé na Trx jsou TPx, Msr a ribonukleotidreduktasy (RNR). TPx katalyzují redukci H₂O₂ s Trx(SH)₂, při níž



Obr. 6 Model katalytického mechanismu DmTrxR. Redukční reakce jsou označeny rychlostními konstantami $k_1 - k_{18}$, oxidační reakce $k_{19} - k_{24}$. MC = Michaelisův komplex (Michaelis complex), MDS = smíšený disulfid (mixed disulfide). Převzato z Huang et al., 2008.

vzniká H_2O a $TrxS_2$. Msr katalyzují redukcí methionin sulfoxidu na methionin. RNR jsou důležité pro syntézu DNA, protože katalyzují přeměnu ribonukleotidů na deoxyribonukleotidy. Msr i RNR obsahují ve své struktuře disulfid, který je nutno zpětně redukovat thioredoxinovým systémem pro možnost dalšího katalytického cyklu (Lee et al., 2013).

Antioxidační účinek Trx se projevuje dvěma způsoby. Zaprvé, Trx slouží jako donor elektronů pro peroxidasy, které vychytávají ROS a tím snižují možnost peroxidace lipidů, poškození DNA a disfunkci proteinů. Zadruhé, Trx působí jako disulfidreduktasa a redukuje oxidované disulfidové vazby jiných proteinů (např. kinasy, fosfatasy

a transkripční faktory), aby se obnovila jejich fyziologická funkce. Zapojení Trx v obraně proti oxidačnímu stresu a udržování redoxní homeostázy byla prokázána např. u *B. mori*, *A. mellifera* či *A. cerana cerana* (Zhang et al., 2015). S tím souhlasí i výsledky dalších studií zaměřených na expresi genů pro TrxR a TPx. Byla potvrzena zvýšená exprese genů pro TrxR u *A. mellifera* a *A. cerana* působením teplotního stresu a oxidantů H₂O₂ a methylviologenu (Koo et al., 2016), u *A. cerana cerana* se jednalo o vliv změny teploty a UV záření (Yang et al., 2010). Exprese genů pro TPx byla u larev *B. mori* po vystavení různým stresovým podmínkám (vysoká a nízká teplota, podání H₂O₂, virová infekce) také značně zvýšená (Lee et al., 2005). U vodního druhu *Chironomus riparius* (řád dvoukřídlí) byla zvýšena exprese genu *CrTrxR* po vystavení vlivu kadmia a paraquatu, což lze považovat za biomarker oxidačního stresu vyvolaného kontaminanty životního prostředí (Nair & Choi, 2012). Kromě oxidačního stresu je Trx v savčích buňkách zapojen i do regulace nitrosačního stresu způsobeného reaktivními formami dusíku, kdy se oxid dusnatý váže na thiolové zbytky proteinů při tzv. S-nitrosylaci. Tato reakce je také součástí buněčných signálních drah (Lee et al., 2013).

2.2.4 Thioredoxinový systém u včel (rod *Apis*)

Antioxidační systém včel obsahuje všechny složky systému thioredoxinového. Genom *A. mellifera* obsahuje tři geny kódující tři varianty Trx: AmTrx-1 s domnělou mitochondriální lokalizací, AmTrx-2 a AmTrx-3. Pro TrxR je to pouze jeden gen kódující dvě varianty enzymu, AmTrxR-1 a AmTrx-2, u žádného ovšem nebyl potvrzen výskyt v mitochondrii. Autoři ale předpokládají, že jedna z variant je mitochondriální, a to z důvodu poskytování redukováného Trx pro mitochondriální TPx, které přeměňují přítomný H₂O₂. Katalasy se v mitochondriích nevyskytují, a proto se nemohou na odstraňování H₂O₂ podílet (Corona & Robinson, 2006). U *A. cerana cerana* byly identifikovány geny *AccTrx-1* a *AccTrx-2*.

Během života jsou včely ovlivňovány různými biotickými a abiotickými faktory, které mohou způsobovat oxidační stres a tím i aktivaci antioxidační obrany zahrnující thioredoxinový systém. Biotickými stresory jsou parazité, houby, bakterie a viry infikující včely, což má za následek rozvoj nemocí. Mezi hlavní abiotické faktory patří změna teploty prostředí, působení pesticidů a výživa (Li et al., 2018). Mnoho studií se zabývá právě vlivem těchto faktorů na organismus včel. V tělech *A. mellifera* a *A. cerana* byla zaznamenána zvýšená exprese genů pro TrxR-1 po vystavení vysoké

(37 °C) či nízké (4 °C) teplotě a po injekci oxidantů parakvatu (methylviologenu) a H₂O₂ (Koo et al., 2016). Yang et al. (2010) zkoumali expresi genu pro TrxR-1 u *A. cerana cerana* a zjistili, že působením UV záření či zvýšené teploty (37°C) se exprese výrazně navýšila ve všech tkáních. U *A. c. cerana* byla zjištěna i zvýšená exprese genu *AccTrx-2*, a to v podmínkách s různou teplotou okolí (4, 16 a 25 °C), dále po injekci H₂O₂, HgCl₂ a pesticidů (cyhalothrin, akaricid, parakvát a phoxim) (Yao et al., 2013). Stejně výsledky poskytlo i zkoumání exprese genu *AccTrx-1*, výjimkou byla pouze snížená exprese po vystavení HgCl₂ (Yao et al., 2014).

Včelí královny mají schopnost skladování a udržování spermatu trubic ve speciálních orgánech zvaných spermatéky. Pro delší přežití spermií v těchto orgánech je důležitá jejich metabolická aktivita, naproti tomu jsou při aerobním metabolismu produkovány ROS, které mohou snižovat životaschopnost spermií. Ve spermatékách královen a semenné tekutině trubic je tedy zvýšené množství antioxidantních enzymů napomáhajících k udržení životaschopnosti spermií. Z proteinů thioredoxinového systému zde byla potvrzena přítomnost Trx-2 a TrxR-1. Rozdíly v množství antioxidantů jsou také mezi královnami, které již byly spářeny a královnami dosud nespářenými. Zvýšená exprese genů pro Trx-2 a TrxR-1 byla zjištěna u oplodněných včelích královen v porovnání s ještě nespářenými královnami. Faktory vedoucí ke zvýšené expresi těchto genů mohou mít původ ve spermatu, semenné tekutině nebo v těle matky, když začíná produkovat vajíčka (Gonzalez et al., 2018).

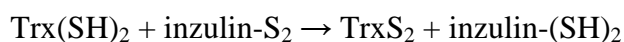
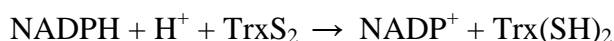
2.2.5 Metody stanovení aktivity thioredoxinreduktas

Ačkoliv jsou TrxR známy již od minulého století, u hmyzu zatím nebyla jejich aktivita příliš zkoumána. Většina publikovaných metod stanovení aktivit těchto enzymů byla provedena u bakterií, rostlin nebo savců. TrxR bakterií a rostlin se ovšem fundamentálně liší od savčí TrxR, jelikož se jedná o enzymy s nízkou M_r, které neobsahují C-terminální disulfid a Sec v aktivním místě enzymu (Gelhaye et al., 2005). Savčí TrxR také oproti bakteriálním a rostlinným TrxR redukuje širší škálu substrátů (Arnér, 2018). TrxR savců i hmyzu se zařazují do skupiny s vyšší M_r, ovšem u hmyzu se předpokládá odlišný mechanismus katalytické reakce z důvodu absence Sec.

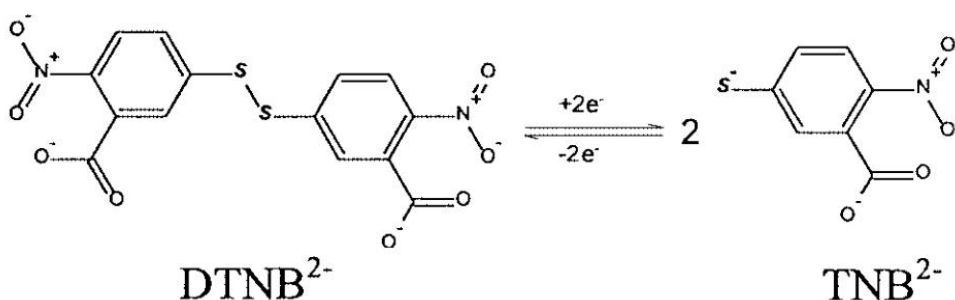
Pro stanovení aktivity savčí TrxR bylo zavedeno několik spektrofotometrických metod s rozličnými substráty. Jedním z nejpoužívanějších substrátů je látka 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina (DTNB), nazývána též Ellmanovo činidlo. Při reakci katalyzované TrxR je DTNB pomocí NADPH redukována na žlutý produkt

5-thionitrobenzoovou kyselinu (TNB), který je měřen spektrofotometricky při 412 nm (Obr. 7). Jednotka aktivity TrxR je pak definována jako množství katalyzující redukci 1 μmol DTNB (tzn. tvorbu 2 μmol TNB) za minutu. Tato reakce je výhodná díky své rychlosti, senzitivitě (vysoký extinkční koeficient TNB), jednoduchosti a finanční nenáročnosti (Gromer et al., 2002). DTNB ovšem není specifickým substrátem, reaguje se všemi thioley v reakční směsi, proto je vhodné srovnání se standardem. V případě, že analyzovaný extrakt obsahuje i GR a GSH, je nutné je nejdříve ze vzorku odstranit, protože by v přítomnosti těchto látek docházelo k redukci DTNB a navýšení naměřených hodnot aktivity TrxR (Arnér & Holmgren, 2001). Při použití specifických inhibitorů savčí TrxR, nejčastěji se jedná o sloučeniny obsahující zlatu např. aurothioglukosa či auranofin, lze snadno měřit absorbancí pozadí reakční směsi (Gromer et al., 2002).

Dalším často využívaným substrátem je inzulin. Pomocí enzymu TrxR a NADPH je redukován Trx, který pak dále redukuje dva disulfidy inzulinu, spotřebu NADPH lze měřit jako změnu absorbance při 340 nm.



Možné je i stanovení aktivity z buněčných lyzátů, a to kombinací s metodou s DTNB. Po redukci inzulinu je reakce zastavena pomocí hydrochlorid guanidinu a thiolové skupiny inzulinu jsou stanoveny pomocí DTNB. Po vytvoření kalibrační křivky s využitím standardů TrxR je možné určit aktivitu enzymu v daném vzorku. Metoda je více specifická než při použití samotného DTNB. Na stejném principu zaznamenávání spotřeby NADPH může být měřena aktivita savčí TrxR s širokou škálou substrátů, např. L-cystinu, L-selenocystinu, seleničitanu, dihydroaskorbátu, alloxanu,



Obr. 7 Schéma redukce DTNB za vzniku dvou molekul TNB. Převzato z Gromer et al., 2002.

S-nitrosoglutathionu a dalších (Arnér et al., 1999). Nejvyšší specifitu reakce lze získat při použití purifikovaného Trx daného organismu jako substrátu, tento postup je ale finančně náročný a né vždy proveditelný. Jako alternativa pro měření aktivity lidské TrxR se využívá Trx z bakterie *Escherichia coli* či parazitického prvoka *Plasmodium falciparum* (Gromer et al., 2002).

Montano et al. (2014) vyvinuli fluorimetrickou metodu pro stanovení aktivity lidské TrxR ve vzorcích, které se běžně používají v biomedicině. Enzymovým substrátem je insulin značený fluorescein-5-isothiokyanátem (FITC), jehož fluorescenční záření bylo detekováno při vlnové délce 520 nm po excitaci zářením o vlnové délce 480 nm. Hlavními výhodami této metody jsou vysoká citlivost a specifita. Metoda byla testována ve vzorcích lidské plazmy, séra, rakovinných buněk či izolovaných lymfocytů.

3 Experimentální část

3.1 Chemikálie

Auranofin (Sigma-Aldrich, Německo)

Coomasie Brilliant Blue G250 (CBB) (Bio-Rad, USA)

Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma-Aldrich, Německo)

5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina (DTNB) (Serva, Německo)

Ethylendiamintetraoctová kyselina, sodná sůl (EDTA) (Sigma-Aldrich, Německo)

Fosforečnan draselný (Sigma-Aldrich, Německo)

Hovězí sérový albumin (BSA) (Sigma-Aldrich, Německo)

Hydroxid sodný (Lachema, Česká republika)

Kyselina fosforečná 85% (Lachner, Česká republika)

Kyselina chlorovodíková (Penta, Česká republika)

L-selenocystin (Sigma-Aldrich, Německo)

Methylviologen (Sigma-Aldrich, Německo)

NADPH, disodná sůl (Serva, Německo)

Seleničitan sodný (Sigma-Aldrich, Německo)

Tris/HCl (Sigma-Aldrich, Německo)

3.2 Biologický materiál

V experimentální části byly použity dospělé včely medonosné různého staří odebrané z včelstev na Pokusném včelíně Brno-Kývalka Výzkumného ústavu včelařského. U vzorků octomilek obecných se jednalo o 14denní dospělé mušky divokého genotypu W1110 kultivované na agarovém médiu, poskytnuté vedoucím práce. Vzorky včel i octomilek byly po odebrání zamrazeny a uschovány při -80 °C.

3.3 Přístroje a vybavení

Analytické váhy (Sartorius, Německo)

Automatické pipety (Eppendorf, Německo)

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

Chlazená centrifuga 5415 R (Eppendorf, Německo)

Mikrodestičkový reader Synergy HT (BioTek Instruments, USA)

Třepačka Thermo-shaker (Biosan, Lotyšsko)

Vortex V-1 plus (Biosan, Lotyšsko)

3.4 Metody

3.4.1 Příprava extraktu

Zmražený vzorek včel či octomilek byl za stálého chlazení homogenizován v třecí misce ve vychlazeném extrakčním pufru v poměru 1:4 (w/v). Pro stanovení celkových proteinů, stanovení aktivity TrxR metodou s DTNB a s L-selenocystinem byl použit pufr o složení $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KPi, $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA, pH 7,0. Pro stanovení aktivity TrxR metodou se seleničitanem sodným byl použit TE pufr obsahující 50 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5. Získaný homogenát byl přenesen do mikrozkušavek a centrifugován 20 minut při 16000 g a 4 °C, následně byl supernatant přenesen do čistých mikrozkušavek a zamražen při -20 °C.

3.4.2 Stanovení celkových proteinů metodou dle Bradforda

Principem metody je reakce proteinů v biologickém vzorku s barvivem Coomasie Brilliant Blue G-250, přičemž dochází k přeměně barvy roztoku z hnědé na modrou a tak i změně absorpčního maxima barviva ze 450 nm na 590 nm ((Bradford, 1976; Zor & Selinger, 1996). Tato změna byla měřena spektrofotometricky na 96jamkové destičce. Do každé jamky bylo napipetováno 45 μl deionizované vody (ddH_2O), 5 μl vzorku a 200 μl pracovního roztoku Bradfordova činidla, destička byla před měřením lehce protřepána a nechána inkubovat 5 minut při laboratorní teplotě. Pro přípravu zásobního roztoku CBB bylo 50 mg CBB rozpuštěno v 25 ml ethanolu a 50 ml 85% kyseliny fosforečné, roztok byl následně doplněn na 100 ml ddH_2O . Pracovní roztok Bradfordova činidla byl připraven vždy nový před měřením, a to zředěním zásobního roztoku ddH_2O v poměru 1:4. Jako standard pro vytvoření kalibrační křivky byl použit hovězí sérový albumin (BSA).

3.4.3 Stanovení aktivity TrxR po tepelné inaktivaci

Pomocí dále zmíněných metod byla v tělních extraktech měřena také aktivita TrxR po tepelné inaktivaci. Vzorek extraktu byl rozdělen na dvě části, přičemž jedna byla použita na samotné měření aktivity TrxR. Druhá část byla inkubována 30 min při teplotě 70 °C, poté byla ponechána při laboratorní teplotě až do vychladnutí. Následně byl vzorek centrifugován 10 minut při 16000g a 4 °C, supernatant byl přenesen do čisté mikrozkušavky. Poté byla ve vzorku stanovena aktivita TrxR podle popsanych postupů.

3.4.4 Stanovení aktivity TrxR end-point metodou s DTNB v extraktu včely medonosné a octomilky obecné

Metoda je založena na reakci kyseliny 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové (DTNB) s NADPH+H⁺ katalyzované TrxR, při reakci je DTNB pomocí NADPH redukována na žlutý produkt 5-thionitrobenzoovou kyselinu (TNB), který je měřen spektrofotometricky při 412 nm (Holmgren & Björnstedt, 1995). Změna absorbance byla sledována při 30°C. Při měření byly použity možné inhibitory TrxR, methylviologen (paraquat) a auranofin, v různých koncentracích. Do každé jamky bylo přidáno 10 µl pracovního roztoku DTNB (finální koncentrace 3,3 mM), 50 µl vzorku (u blanku pouze stejné množství pufru), 10 µl NADPH (finální koncentrace 200 µM), inhibitor o objemu 0, 30, 60 nebo 90 µl a odpovídající množství pufru, přičemž celkový objem inhibitoru a pufru činí 230 µl. Reakční směs byla jemně protřepána a inkubována 5 min při laboratorní teplotě, NADPH bylo přidáno vždy jako poslední pro zahájení reakce. Měření probíhalo vždy v triplikátech. Roztok DTNB byl připraven rozpuštěním 39,6 mg DTNB v 1 ml DMSO a roztok NADPH rozpuštěním 4,93 mg NADPH v 1 ml pracovního pufru. Pracovní roztok inhibitoru methylviologenu byl připraven rozpuštěním 25,7 mg methylviologenu v 1 ml ddH₂O a následným zředěním na konečnou koncentraci 10 mmol·l⁻¹. Rozpuštěním 1 g auranofinu v 1 ml DMSO byl připraven zásobní roztok auranofinu, který byl dále zředěn na finální pracovní koncentraci 0,3 µmol·l⁻¹.

3.4.5 Stanovení aktivity TrxR metodou s L-selenocystinem v extraktu včely medonosné

Principem metody je specifická redukce L-selenocystinu (SC) pomocí TrxR a NADPH. SC je neesenciální aminokyselina odvozená od Sec obsahující dva atomy selenu. Při redukci se SC štěpí na dvě molekuly Sec, spotřebu NADPH pro tuto redukci je možné zaznamenat spektrofotometricky jako pokles absorbance při 340 nm (Cunniff et al., 2013). Měření bylo provedeno na 96jamkové destičce v triplikátech, do každé jamky bylo postupně přidáno 40 µl pracovního pufru, 20 µl 4 mM SC, 20 µl vzorku a 20 µl 2mM NADPH pro zahájení reakce. Při použití inhibitoru methylviologenu bylo pipetováno 10, 20 nebo 30 µl inhibitoru tak, aby součet objemů inhibitoru a pufru činil 40 µl. V kontrolních roztocích byl vynechán přírůstek SC, NADPH nebo obou látek zároveň (objem roztoku v jamce byl vždy doplněn pufrům na 100 µl). Reakční směs byla před měřením promíchána a inkubována 5 minut při laboratorní teplotě. Změna

absorbance byla měřena po dobu 20 minut v 30s intervalech. Zásobní roztok SC byl připraven rozpuštěním 13,4 mg L-selenocystinu ve 200 μl 1M NaOH, přidáním 100 μl 1M HCl a doplnění objemu na 1 ml pomocí ddH₂O. Zásobní roztok SC o koncentraci 40 mM byl následně zředěn na koncentraci 4 mM pro samotné měření. 2mM roztok NADPH byl připraven rozpuštěním 1,67 mg NADPH v 1 ml pracovního pufru. Pracovní roztok inhibitoru methylviologenu byl připraven rozpuštěním 25,7 mg methylviologenu v 1 ml ddH₂O a následným zředěním na konečnou koncentraci 10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$.

3.4.6 Stanovení aktivity TrxR metodou se seleničitanem sodným v extraktu včely medonosné

Metoda je založena na detekci změny absorbance vlivem spotřeby NADPH. Jako substrát pro TrxR byla použita nízkomolekulární anorganická látka seleničitan sodný, který je redukován pomocí TrxR a NADPH (Arnér et al., 1999). Měření bylo provedeno na 96jamkové destičce vždy v triplikátu. Do každé jamky bylo přidáno 50 μl extraktu, 10 μl NADPH (finální koncentrace 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a vhodné množství TE pufru, aby byl konečný objem v jamce i s následně přidaným inhibitorem 300 μl . Po 10minutové inkubaci byl do jamky přidán inhibitor methylviologen o různé konečné koncentraci a proběhla další inkubace vzorku po dobu asi 5 minut. Pro zahájení reakce bylo přidáno 10 μl seleničitanu o finální koncentraci 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Změna absorbance byla měřena 10 minut při vlnové délce 340 nm. Kontrola obsahovala pouze TE pufr, NADPH a seleničitan. Zásobní roztok 30 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ seleničitanu sodného byl připraven rozpuštěním 5,18 mg seleničitanu v 1 ml TE pufru, pracovní roztok byl následně 10x zředěn. Roztok NADPH byl připraven rozpuštěním 4,93 mg NADPH v 1 ml TE pufru. Pracovní roztok methylviologenu byl připraven rozpuštěním 25,7 mg methylviologenu v 1 ml ddH₂O, který byl poté zředěn na konečnou koncentraci 10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Rozpuštěním 1 g auranofinu v 1 ml DMSO byl připraven zásobní roztok auranofinu, přičemž byl roztok dále zředěn na finální pracovní koncentraci 0,3 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

3.4.7 Zpracování výsledků

Všechna data získána z popsaných experimentů byla zpracována v programu Microsoft Excel 2007, včetně vytvořených grafů. Chybové úsečky v grafech značí směrodatnou odchylku vypočítanou z hodnot získaných měření vzorků v technických triplikátech.

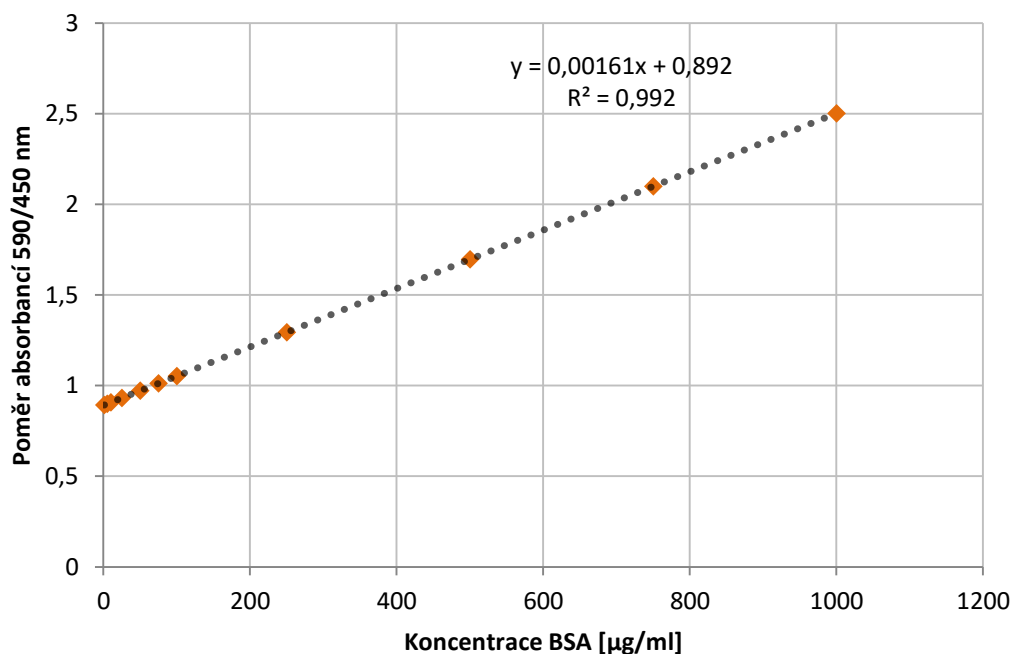
4 Výsledky a diskuze

4.1 Stanovení celkových proteinů metodou dle Bradforda

Po proměření připravených standardů BSA o koncentraci 1-1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ byla sestrojena kalibrační přímka závislosti poměru absorbancí při 590 a 450 nm na koncentraci BSA (Obr. 8). Rovnice kalibrační přímky byla následně použita pro určení koncentrace celkových proteinů v extraktech, na kterou byla později vztažena vypočítaná specifická aktivita TrxR.

4.2 Stanovení aktivity TrxR po tepelné inaktivaci

V získaných extraktech včely medonosné a octomilky obecné byla provedena inaktivace enzymů vysokou teplotou a poté byla měřena aktivita TrxR danou metodou. Zaznamenané výsledky udávají míru vedlejších reakcí v pozadí mezi jednotlivými složkami reakční směsi mimo TrxR. U metody s DTNB tvořily reakce v pozadí 3,3 % z naměřené změny absorbance, u metody se SC se jednalo o 35 % a v případě metody se seleničitanem sodným 9,3 %. Hodnoty aktivit naměřené u denaturovaných vzorků byly odečteny od hodnot aktivit získaných při stanovení aktivity enzymu v původních extraktech.



Obr. 8 Kalibrace stanovení celkových proteinů metodou Bradforda s použitím BSA – kalibrační přímka závislosti poměru absorbancí 590/450 nm na koncentraci BSA. Rovnice přímky je $y = 0,00161x + 0,892$ s hodnotou spolehlivosti $R^2 = 0,992$

4.3 Stanovení aktivity TrxR end-point metodou s DTNB v extraktu včely medonosné a octomilky obecné

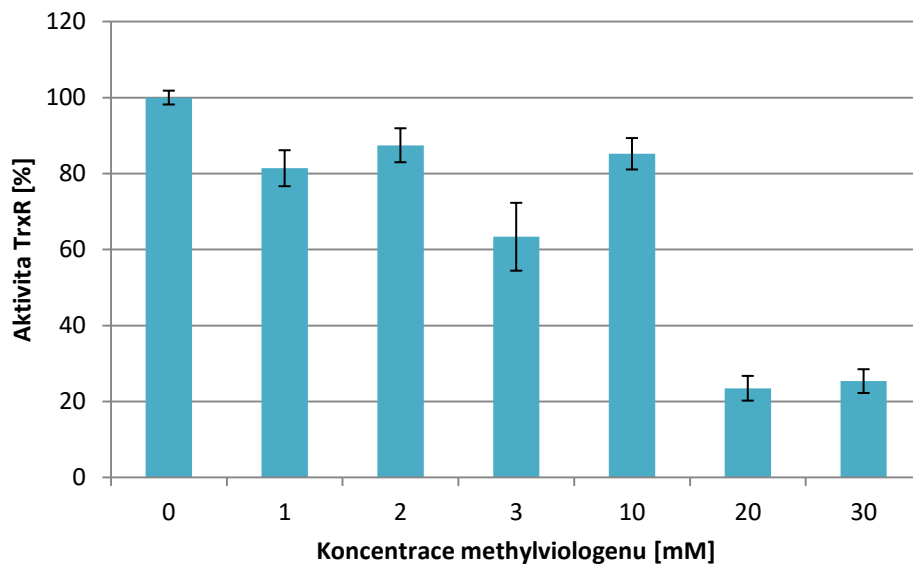
Bylo provedeno stanovení aktivity TrxR pomocí metody použité v práci Kanzok et al. (2001). Jako substrát pro TrxR byla použita látka DTNB, která po redukci vytváří žlutě zbarvený produkt, jehož produkce je sledována spektrofotometricky při vlnové délce 412 nm. Měřením změny absorbance a následným výpočtem se vztahením na celkový obsah proteinů ve vzorku byla určena specifická aktivita TrxR. DTNB ovšem není specifickým substrátem pro TrxR a mohou jej redukovat také další oxidoreduktasy obsažené ve vzorku, které využívají NADPH. Bez další purifikace enzymu z extraktu tak není možné určit přesnou specifickou aktivitu TrxR.

V tělních extraktech *A. mellifera* a *D. melanogaster* byla stanovena aktivita u nezředěného a 5x a 10x zředěného vzorku (Tab. 1). Získané hodnoty jsou nižší než v původním článku Kanzok et al. (2001), kde byla naměřena specifická aktivita DmTrxR $24,5 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, tedy $405,08 \text{ nkat} \cdot \text{mg}^{-1}$. Byly též uvedeny kinetické parametry pro DmTrx ($K_m = 7,0 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$), NADPH ($K_m = 6,5 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$) a DTNB ($K_m = 310 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$). Experiment byl však prováděn s rekombinantními enzymy, které byly následně purifikovány, výsledky tak nebyly ovlivňovány vedlejšími reakcemi dalších látek obsažených v tělních extraktech (např. jiné thiolové proteiny).

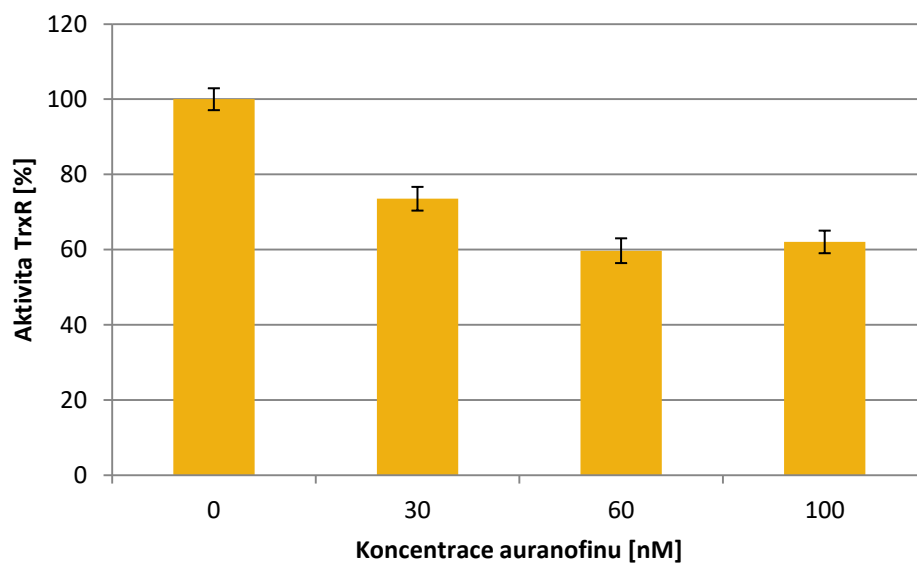
V původním článku je stanovována aktivita TrxR u *D. melanogaster* s použitím inhibitoru methylviologenu. V této práci byl sledován vliv možných inhibitorů methylviologenu a auranofinu na aktivitu enzymu. U extraktu z *D. melanogaster* byl použit pouze inhibitor methylviologen, a to jen v nižších koncentracích 1, 2, a $3 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, jelikož nebylo dostupné dostatečné množství biologického materiálu pro přípravu extraktu. Výsledky tak slouží spíše pro výchozí porovnání s původním článkem. U *A. mellifera* bylo provedeno měření aktivity TrxR při inhibici methylviologinem o koncentracích 1, 2, 3, 10, 20 a $30 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ (Obr. 9) a při inhibici auranofinem o koncentraci 30, 60 a $100 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ (Obr. 10).

Tabulka 1 Specifická aktivita TrxR v extraktu *A. mellifera* a *D. melanogaster* stanovená end-point metodou s použitím DTNB

Organismus	Specifická aktivita TrxR ve vzorku [$\text{nkat} \cdot \text{mg}^{-1}$]		
	Bez ředění	5x ředění	10x ředění
<i>A. mellifera</i>	$0,320 \pm 0,006$	$0,268 \pm 0,008$	$0,330 \pm 0,005$
<i>D. melanogaster</i>	$0,332 \pm 0,016$	$0,308 \pm 0,004$	$0,138 \pm 0,008$



Obr. 9 Stanovení inhibice aktivity AmTrxR methylviogelem. Každý vzorek byl měřen v technickém triplikátu.



Obr. 10 Stanovení inhibice aktivity AmTrxR auranginem. Každý vzorek byl měřen v technickém triplikátu.

Podle Kanzok et al. (2001) byla enzymová aktivita DmTrxR inhibována na 30 % při použití $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ methylviologenu a zcela inhibována při použití $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ methylviologenu. Výsledky získané v rámci této bakalářské práce se ovšem liší. Aktivita enzymu se při inhibici $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ methylviologenum snížila o 7-25 % v různě zředěných vzorcích. Úplná inhibice enzymové aktivity nebyla zaznamenána ani při třikrát zvýšené koncentraci methylviologenu. Aktivita AmTrxR (TrxR z extraktu *A. mellifera*) klesla po přidání methylviologu s konečnou koncentrací $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ o 9–18 % v různě zředěných roztocích. Výrazná inhibice enzymové aktivity asi o 75 % nastala až při použití methylviologenu o konečné koncentraci 20 a $30 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Mechanismus inhibičního účinku methylviologenu je dvojitý: generování superoxidového aniontu, který může vést k tvorbě toxičtějších ROS, jako jsou peroxid vodíku a hydroxylový radikál, nebo oxidace buněčného NADPH, hlavního zdroje redukčních ekvivalentů, mimo jiné také pro TrxR (Suntres, 2002). Methylviologen by tak mohl být využíván jako univerzálnější inhibitor, jelikož se přímo neváže na enzym a jeho inhibiční účinky tak nejsou přímo závislé na struktuře aktivního místa enzymu.

Jako druhý testovaný inhibitor byl použit auranofin. Aktivita AmTrxR byla nejvíce inhibována 60 a $100 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ auranofinem, a to o 40 a 38 %. Auranofin a jiné organické sloučeniny zlata jsou známé jako dobré inhibitory lidské TrxR, ovšem u *D. melanogaster* nebyly tyto inhibiční účinky auranofinu prokázány (Kanzok et al., 2001). Důvodem může být absence Sec v aktivním místě hmyzí TrxR, kde se váže inhibitor. Sec je za běžných experimentálních podmínek účinnější v navázání molekuly zlata než Cys, pravděpodobně díky nižšímu pKa, kdy si narozdíl od Cys udržuje záporný náboj (Saccoccia et al., 2014). Na vzorcích z *A. mellifera* nebyl dosud auranofin testován, zdá se však, že jeho vliv na AmTrxR není zanedbatelný.

4.4 Stanovení aktivity TrxR metodou s L-selenocystinem v extraktu včely medonosné

Při stanovení aktivity lidské TrxR podle Cunniff et al. (2013) bylo využito jako specifického substrátu L-selenocystinu, který kromě TrxR nebyl redukován jinou NADPH reduktasou obsaženou v buňkách. Stejný substrát byl testován v této bakalářské práci pro měření aktivity AmTrxR, jako inhibitory enzymové reakce byly použity látky methylviologen o koncentracích 1, 2, a $3 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Tab. 2) a auranofin o koncentraci 30, 60 a $100 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Tab. 3).

Aktivita AmTrxR měřená touto metodou byla o 70 – 80 % nižší než aktivita enzymu stanovená metodou s DTNB či seleničitanem sodným. Inhibice enzymové reakce methylviologinem nebyla příliš účinná, ve dvou případech byla naměřená aktivita v přítomnosti inhibitoru vyšší než aktivita enzymu stanovená bez přídavku inhibitoru. Měření bylo nejspíše ovlivněno vedlejšími reakcemi substrátu a inhibitoru v reakční směsi. Neuspokojivé výsledky byly získány také při testování inhibice aktivity TrxR auranofinem. I když se aktivita enzymu snížila o 10 % po inhibici 60 nmol·l⁻¹ auranofinem, při zvýšené koncentraci 100 nmol·l⁻¹ hodnota aktivity opět vzrostla. Metoda tak není vhodná pro měření AmTrxR z extraktu, pro úplné potvrzení použitelnosti SC jako substrátu by bylo potřeba použití purifikované TrxR při měření aktivity. Bylo ukázáno, že SC je účinně redukován savčí TrxR s kinetickými hodnotami ($K_m = 6 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $k_{\text{cat}} = 3200 \text{ min}^{-1}$) blízkými přirozenému substrátu Trx (Misra et al., 2018). Možným vysvětlením absence aktivity AmTrxR při použití SC jako substrátu je předpokládaná rozdílná struktura aktivního místa oproti lidské TrxR, přesněji náhrada Sec na C-terminálním konci za Cys. Sec je obecně považován za reaktivnější než Cys, proto i množství substrátů pro lidskou TrxR může být větší než u AmTrxR.

Tab. 2 Stanovení specifické aktivity TrxR v extraktu *A. mellifera* při použití inhibitoru methylviologenu metodou s L-selenocytinem

Koncentrace inhibitoru [mmol·l ⁻¹]	Specifická aktivita TrxR ve vzorku [nkat·mg ⁻¹]
0	0,054 ± 0,002
1	0,063 ± 0,002
2	0,052 ± 0,001
3	0,063 ± 0,001

Tab. 3 Stanovení specifické aktivity TrxR v extraktu *A. mellifera* při použití inhibitoru auranofinu metodou s L-selenocytinem

Koncentrace inhibitoru [nmol·l ⁻¹]	Specifická aktivita TrxR ve vzorku [nkat·mg ⁻¹]
0	0,063 ± 0,002
30	0,060 ± 0,004
60	0,057 ± 0,003
100	0,062 ± 0,003

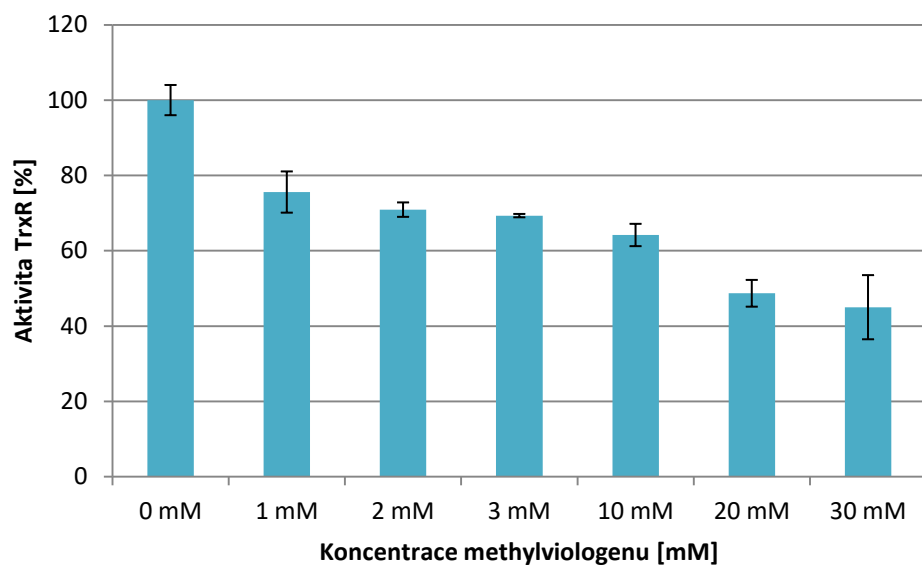
4.5 Stanovení aktivity TrxR metodou se seleničitanem sodným v extraktu včely medonosné

Substrátem pro TrxR je při této metodě nízkomolekulární anorganická látka seleničitan sodný, který oxiduje thiolové skupiny TrxR. Arnér et al. (1999) zahrnují seleničitan mezi substráty vhodné pro měření aktivity lidské TrxR a testování inhibice tohoto enzymu potenciálním inhibitorem. Při měření aktivity AmTrxR byly použity inhibitory methylviologen o koncentracích 1, 2, 3, 10, 20 a 30 mmol·l⁻¹ (Obr. 11) a auranofin o koncentraci 30, 60 a 100 nmol·l⁻¹ (Obr. 12).

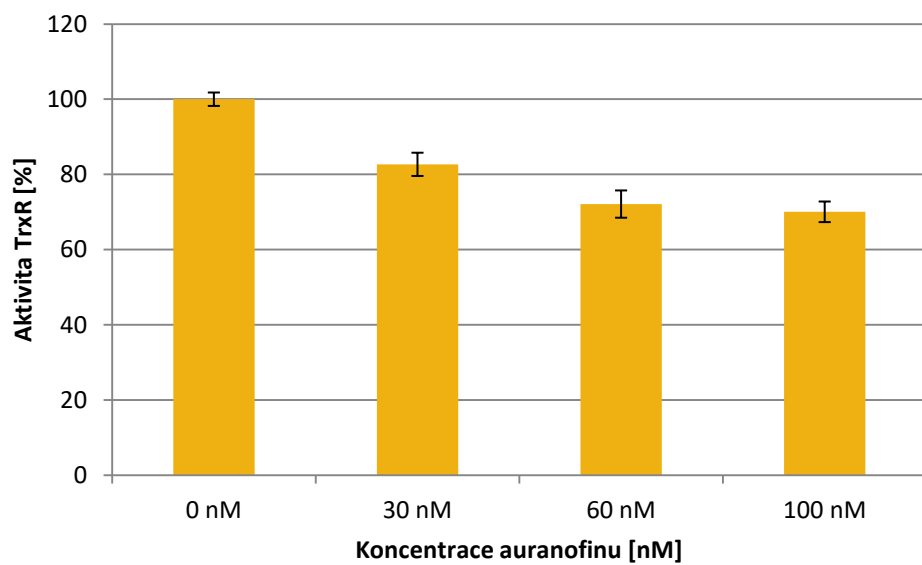
Naměřená aktivita AmTrxR se seleničitanem sodným jako substrátem (Tab. 4) je srovnatelná s hodnotami získanými pomocí metody s DTNB a vysoce tak přesahuje hodnoty aktivity měřené metodou se SC. Přídavek methylviologenu o konečné koncentraci 1 mmol·l⁻¹ snížil aktivitu enzymu o 10 – 25 %. Největší pokles aktivity byl zaznamenán po inhibici 30 mmol·l⁻¹ methylviologenu, a to o 55 %. Účinek methylviologenu při vyšších koncentracích tak není srovnatelný s výsledky u metody s DTNB a důvodem zde mohou být jiné vedlejší interakce inhibitoru či enzymu se substrátem. Jako další inhibitor byl použit auranofin. Inhibice 60 nmol·l⁻¹ a 100 nmol·l⁻¹ auranofinem snížila aktivitu o 28 % a 30%, což značí opět menší pokles než v případě metody s DTNB. Tyto inhibitory nebyly zatím dříve testovány pro inhibici AmTrxR, proto není zcela jasné, jaký je mechanismus této inhibice a jaké vedlejší reakce mohou probíhat mezi jednotlivými složkami reakční směsi. Možné vysvětlení pro nižší účinnost inhibitorů při této metodě je menší specifická metoda, přičemž se na redukci substrátu podílejí i další oxidoreduktasy obsažené v extraktu, které jsou méně či vůbec inhibovány danými látkami.

Tab. 4 Specifická aktivita TrxR v extraktu *A. mellifera* při stanovení metodou se seleničitanem sodným

Organismus	Specifická aktivita TrxR ve vzorku [nkat·mg ⁻¹]		
	Bez ředění	5x ředění	10x ředění
<i>A. mellifera</i>	0,344 ± 0,014	0,362 ± 0,008	0,343 ± 0,025



Obr. 11 Stanovení inhibice aktivity AmTrxR methylviologenum. Každý vzorek byl měřen v technickém triplikátu.



Obr. 12 Stanovení inhibice aktivity AmTrxR auranofinem. Každý vzorek byl měřen v technickém triplikátu.

5 Závěr

V teoretické části práce byly shrnuty dostupné informace o antioxidačním systému hmyzu. Bylo popsáno působení oxidačního stresu a jaké vnější či vnitřní faktory jej ovlivňují. V rámci popisu antioxidační ochrany byly vysvětleny funkční mechanismy jednotlivých látek patřících do enzymové či neenzymové složky antioxidačního systému. Dále byla zaměřena pozornost na thioredoxinový systém, jeho součásti a funkci v antioxidační ochraně hmyzu, zvláště zástupců rodu *Apis*.

V praktické části bakalářské práce byly testovány spektrofotometrické metody stanovení aktivity TrxR u včely medonosné. Metoda s DTNB a metoda se seleničitanem sodným poskytly srovnatelné výsledky stanovení aktivity enzymu z extraktu včel. Naopak SC se zdá být nevhodným substrátem pro AmTrxR, protože naměřená aktivita byla výrazně nižší než dalších testovaných metod. Důvodem může být absence Sec v aktivním místě AmTrxR. Jako možné inhibitory AmTrxR byly testovány methylviologen a auranofin. Methylviologen o koncentraci $30 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ inhiboval aktivitu AmTrxR až o 75 % u metody s DTNB, avšak pouze o 55 % u metody se seleničitanem sodným. Auranofin o koncentraci $60 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ použitý u metody s DTNB inhiboval aktivitu AmTrxR o 40 %, při stanovení aktivity AmTrxR metodou se seleničitanem sodným byla aktivita nejvíce inhibována $100 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ auranofinem, a to o 30 %. Při stanovení aktivity metodou se SC nebyla zaznamenána výrazná inhibice enzymu ani jedním z testovaných inhibitorů. Pro další optimalizaci stanovení aktivity AmTrxR by měly být vyzkoušeny metody purifikace enzymu či příprava rekombinantního enzymu a následné ověření použitých spektrofotometrických metod.

6 Literatura

Arnér, E. S. J. (2018). Selective evaluation of thioredoxin reductase enzymatic activities. *Methods in Molecular Biology*, 1661, 301 - 309. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7258-6_21

Arnér, E. S., Zhong, L., & Holmgren, A. (1999). Preparation and assay of mammalian thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods in enzymology*, 300, 226-39. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(99\)00129-9](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(99)00129-9)

Bahadorani, S., Bahadorani, P., Phillips, J. P., & Hilliker, A. J. (2008). The Effects of Vitamin Supplementation on Drosophila Life Span Under Normoxia and Under Oxidative Stress. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 63(1), 35-42. <https://doi.org/10.1093/gerona/63.1.35>

Balsera, M., & Buchanan, B. B. (2019). Evolution of the thioredoxin system as a step enabling adaptation to oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 140, 28-35. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.03.003>

Bauer, H., Kanzok, S. M., & Schirmer, R. H. (2002). Thioredoxin-2 but Not Thioredoxin-1 Is a Substrate of Thioredoxin Peroxidase-1 from *Drosophila melanogaster*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(20), 17457-17463. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200636200>

Bauer, H., Massey, V., Arscott, L. D., Schirmer, R. H., Ballou, D. P., & Williams, C. H. (2003). The Mechanism of High M_r Thioredoxin Reductase from *Drosophila melanogaster*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(35), 33020-33028. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303762200>

Brudzynski, K. (2020). A current perspective on hydrogen peroxide production in honey. A review. *Food Chemistry*, 332. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127229>

Cao, Y., Yang, Q., Tu, X. -H., Li, S. -G., & Liu, S. (2018). Molecular characterization of a typical 2-Cys thioredoxin peroxidase from the Asiatic rice borer *Chilo suppressalis* and its role in oxidative stress. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 99(1). <https://doi.org/10.1002/arch.21476>

Corona, M., & Robinson, G. E. (2006). Genes of the antioxidant system of the honey bee: annotation and phylogeny. *Insect Molecular Biology*, 15(5), 687-701. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2006.00695.x>

Cunniff, B., Snider, G. W., Fredette, N., Hondal, R. J., & Heintz, N. H. (2013). A direct and continuous assay for the determination of thioredoxin reductase activity in cell lysates. *Analytical Biochemistry*, 443(1), 34-40. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2013.08.013>

Dias, F. A., Gandara, A. C. P., Perdomo, H. D., Gonçalves, R. S., Oliveira, C. R., Oliveira, R. L. L., Citelli, M., Polycarpo, C. R., Santesmasses, D., Mariotti, M., Guigó, R., Braz, G. R., Missirlis, F., & Oliveira, P. L. (2016). Identification of a selenium-dependent glutathione peroxidase in the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 69, 105-114. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2015.08.007>

de Zwart, L. L., Meerman, J. H. N., Commandeur, J. N. M., & Vermeulen, N. P. E. (1999). Biomarkers of free radical damage. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(1-2), 202-226. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00196-8](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00196-8)

Duttaroy, A., Paul, A., Kundu, M., & Belton, A. (2003). A Sod2 Null Mutation Confers Severely Reduced Adult Life Span in *Drosophila*. *Genetics*, 165(4), 2295-2299. <https://doi.org/10.1093/genetics/165.4.2295>

Dunkov, B., & Georgieva, T. (2006). Insect iron binding proteins: Insights from the genomes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36(4), 300-309. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2006.01.007>

Eckenroth, B. E., Rould, M. A., Hondal, R. J., & Everse, S. J. (2007). Structural and Biochemical Studies Reveal Differences in the Catalytic Mechanisms of Mammalian and *Drosophila melanogaster* Thioredoxin Reductases. *Biochemistry*, 46(16), 4694-4705. <https://doi.org/10.1021/bi602394p>

Farjan, M., Dmitryjuk, M., Lipiński, Z., Biernat-Łopieńska, E., & Żółtowska, K. (2015). Supplementation of the honey bee diet with vitamin C: The effect on the antioxidative system of

- Apis mellifera carnica brood at different stages. *Journal of Apicultural Research*, 51(3), 263-270. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.51.3.07>
- García-Caparrós, P., De Filippis, L., Gul, A., Hasanuzzaman, M., Ozturk, M., Altay, V., & Lao, M. T. (2020). Oxidative Stress and Antioxidant Metabolism under Adverse Environmental Conditions: a Review. *The Botanical Review*, 87(4), 421–466. <https://doi.org/10.1007/s12229-020-09231-1>
- Gelhaye, E., Rouhier, N., Navrot, N., & Jacquot, J. P. (2005). The plant thioredoxin system. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(1), 24-35. <https://doi.org/10.1007/s00018-004-4296-4>
- Gonzalez, A. N., Ing, N., & Rangel, J. (2018). Upregulation of antioxidant genes in the spermathecae of honey bee (*Apis mellifera*) queens after mating. *Apidologie*, 49(2), 224-234. <https://doi.org/10.1007/s13592-017-0546-y>
- Gromer, S., Merkle, H., Heiner Schirmer, R., & Becker, K. (2002). Human placenta thioredoxin reductase: Preparation and inhibitor studies. *Methods in Enzymology*, 347, 382-394. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(02\)47038-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(02)47038-3)
- Haslam, E. (2001). *Natural Polyphenols as Drugs and Medicines: Potential Modes of Action* (Vol. 48). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-015-9644-2>
- Holmgren, A., & Björnstedt, M. (1995). Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods in enzymology*, 252, 199-208. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(95\)52023-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(95)52023-6)
- Hu, Z., Lee, K. S., Choo, Y. M., Yoon, H. J., Lee, S. M., Lee, J. H., Kim, D. H., Sohn, H. D., & Jin, B. R. (2010). Molecular cloning and characterization of 1-Cys and 2-Cys peroxiredoxins from the bumblebee *Bombus ignitus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 155(3), 272-280. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2009.11.011>
- Huang, H. -H., Arscott, L. D., Ballou, D. P., & Williams, C. H. (2008). Acid–Base Catalysis in the Mechanism of Thioredoxin Reductase from *Drosophila melanogaster*. *Biochemistry*, 47(6), 1721-1731. <https://doi.org/10.1021/bi702040u>
- Hulbert, A. J., Faulks, S. C., & Buffenstein, R. (2006). Oxidation-Resistant Membrane Phospholipids Can Explain Longevity Differences Among the Longest-Living Rodents and Similarly-Sized Mice. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 61(10), 1009-1018. <https://doi.org/10.1093/gerona/61.10.1009>
- Chaitanya, R., Shashank, K., & Sridevi, P. (2016). *Oxidative Stress in Invertebrate Systems*. In (Ed.), *Free Radicals and Diseases*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/64573>
- Jumarie, C., Aras, P., & Boily, M. (2017). Mixtures of herbicides and metals affect the redox system of honey bees. *Chemosphere*, 168, 163-170. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.10.056>
- Kanzok, S. M., Fechner, A., Bauer, H., Ulschmid, J. K., Müller, H. -M., Botella-Munoz, J., Schnewly, S., Schirmer, R. H., & Becker, K. (2001). Substitution of the Thioredoxin System for Glutathione Reductase in *Drosophila melanogaster*. *Science*, 291(5504), 643-646. <https://doi.org/10.1126/science.291.5504.643>
- Kim, B. Y., Lee, K. S., Choo, Y. M., Kim, I., Je, Y. H., Woo, S. D., Lee, S. M., Park, H. C., Sohn, H. D., & Jin, B. R. (2008). Insect transferrin functions as an antioxidant protein in a beetle larva. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 150(2), 161-169. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2008.02.009>
- Kohen, R., & Nyska, A. (2002). Invited Review: Oxidation of Biological Systems. *Toxicologic Pathology*, 30(6), 620-650. <https://doi.org/10.1080/01926230290166724>
- Koháryová, M., & Kollárová, M. (2015). Thioredoxin system – a novel therapeutic target. *General physiology and biophysics*, 34(02), 221-233. https://doi.org/10.4149/gpb_2015006
- Koo, H. -N., Lee, S. -G., Yun, S. -H., Kim, H. K., Choi, Y. S., & Kim, G. -H. (2016). Comparative Analyses of Cu-Zn Superoxide Dismutase (SOD1) and Thioredoxin Reductase (TrxR) at the mRNA Level between *Apis mellifera* L. and *Apis cerana* F. (Hymenoptera: Apidae) Under Stress Conditions. *Journal of Insect Science*, 16(1), 1-6. <https://doi.org/10.1093/jisesa/iev159>

Korayem, A., Khodairy, M., Abdel-Aal, A. -A., & El-Sonbaty, A. (2012). The protective strategy of antioxidant enzymes against hydrogen peroxide in honey bee, *Apis mellifera* during two different seasons. *Journal of Biology and Earth Sciences*, 2(2), B93–B109. <https://doaj.org/article/c06f7458fc8c433ea3651dedc660715f>

Krishnan, N., & Kodrik, D. (2006). Antioxidant enzymes in *Spodoptera littoralis* (Boisduval): Are they enhanced to protect gut tissues during oxidative stress? *Journal of Insect Physiology*, 52(1), 11-20. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2005.08.009>

Krishnan, N., & Kodrik, D. (2011). Endocrine Control of Oxidative Stress in Insects. *Oxidative Stress in Vertebrates and Invertebrates*, 259-270. <https://doi.org/10.1002/9781118148143.ch18>

Kumar, S., Björnstedt, M., & Holmgren, A. (1992). Selenite is a substrate for calf thymus thioredoxin reductase and thioredoxin and elicits a large non-stoichiometric oxidation of NADPH in the presence of oxygen. *European Journal of Biochemistry*, 207(2), 435-439. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1992.tb17068.x>

Landis, G. N., & Tower, J. (2005). Superoxide dismutase evolution and life span regulation. *Mechanisms of Ageing and Development*, 126(3), 365-379. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2004.08.012>

Lee, K., Rylukim, S., Sookpark, N., Kim, I., Dongkang, P., Heesohn, B., Hochoi, K., Wookang, S., Hoje, Y., & Monglee, S. (2005). Characterization of a silkworm thioredoxin peroxidase that is induced by external temperature stimulus and viral infection. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35(1), 73-84. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2004.09.008>

Lee, S., Kim, S. M., & Lee, R. T. (2013). Thioredoxin and Thioredoxin Target Proteins: From Molecular Mechanisms to Functional Significance. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(10), 1165-1207. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4322>

Li, G., Zhao, H., Liu, Z., Wang, H., Xu, B., & Guo, X. (2018). The Wisdom of Honeybee Defenses Against Environmental Stresses. *Frontiers in Microbiology*, 9, 722-737. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00722>

Lu, J., & Holmgren, A. (2014). The thioredoxin antioxidant system. *Free Radical Biology and Medicine*, 66, 75-87. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.036>

Matsuzawa, A. (2017). Thioredoxin and redox signaling: Roles of the thioredoxin system in control of cell fate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 617, 101-105. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.09.011>

Misra, S., & Björnstedt, M. (2018). *Selenocystine and Cancer*. Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-95390-8_14

Monaghan, P., Metcalfe, N. B., & Torres, R. (2009). Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. *Ecology Letters*, 12(1), 75-92. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01258.x>

Montano, S. J., Lu, J., Gustafsson, T. N., & Holmgren, A. (2014). Activity assays of mammalian thioredoxin and thioredoxin reductase: Fluorescent disulfide substrates, mechanisms, and use with tissue samples. *Analytical Biochemistry*, 449, 139-146. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2013.12.025>

Nair, P. M. G., & Choi, J. (2012). Characterization and transcriptional regulation of thioredoxin reductase 1 on exposure to oxidative stress inducing environmental pollutants in *Chironomus riparius*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 161(2), 134-139. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2011.10.007>

Niki, E. (2014). Role of vitamin E as a lipid-soluble peroxyl radical scavenger: in vitro and in vivo evidence. *Free Radical Biology and Medicine*, 66, 3-12. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.03.022>

Nimse, S. B., & Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances*, 5(35), 27986-28006. <https://doi.org/10.1039/C4RA13315C>

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

- Parker, J. D., Parker, K. M., Sohal, B. H., Sohal, R. S., & Keller, L. (2004). Decreased expression of Cu-Zn superoxide dismutase 1 in ants with extreme lifespan. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(10), 3486-3489. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400222101>
- Saccoccia, F., Angelucci, F., Boumis, G., Carotti, D., Desiato, G., E Miele, A., & Bellelli, A. (2014). Thioredoxin reductase and its inhibitors. *Current Protein and Peptide Science*, *15*(6), 621-646. <https://doi.org/10.2174/1389203715666140530091910>
- 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502681103>
- Shi, H., Pei, L., Gu, S., Zhu, S., Wang, Y., Zhang, Y., & Li, B. (2012). Glutathione S-transferase (GST) genes in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*, and comparative analysis with five additional insects. *Genomics*, *100*(5), 327-335. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2012.07.010>
- Schulte, F., Mäder, J., Kroh, L. W., Panne, U., & Kneipp, J. (2009). Characterization of Pollen Carotenoids with in situ and High-Performance Thin-Layer Chromatography Supported Resonant Raman Spectroscopy. *Analytical Chemistry*, *81*(20), 8426-8433. <https://doi.org/10.1021/ac901389p>
- Słowińska, M., Nynca, J., Wilde, J., Bąk, B., Siuda, M., & Ciereszko, A. (2016). Total antioxidant capacity of honeybee haemolymph in relation to age and exposure to pesticide, and comparison to antioxidant capacity of seminal plasma. *Apidologie*, *47*(2), 227-236. <https://doi.org/10.1007/s13592-015-0391-9>
- Sun, J., Molitor, J., & Tower, J. (2004). Effects of simultaneous over-expression of Cu/ZnSOD and MnSOD on *Drosophila melanogaster* life span. *Mechanisms of Ageing and Development*, *125*(5), 341-349. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2004.01.009>
- Sun, L., Yin, J., Du, H., Liu, P., & Cao, C. (2020). Characterisation of GST genes from the *Hyphantria cunea* and their response to the oxidative stress caused by the infection of *Hyphantria cunea* nucleopolyhedrovirus (HcNPV). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *163*, 254-262. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.11.019>
- Suntres, Z. E. (2002). Role of antioxidants in paraquat toxicity. *Toxicology*, *180*(1), 65-77. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00382-7](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00382-7)
- von Lintig, J., Moon, J., & Babino, D. (2021). Molecular components affecting ocular carotenoid and retinoid homeostasis. *Progress in Retinal and Eye Research*, *80*. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2020.100864>
- Wahl, M. C., Irmeler, A., Hecker, B., Schirmer, R. H., & Becker, K. (2005). Comparative Structural Analysis of Oxidized and Reduced Thioredoxin from *Drosophila melanogaster*. *Journal of Molecular Biology*, *345*(5), 1119-1130. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.11.004>
- Wang, X. (1999). Vitamin E and its function in membranes. *Progress in Lipid Research*, *38*(4), 309-336. [https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(99\)00008-9](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(99)00008-9)
- Weirich, G. F., Collins, A. M., & Williams, V. P. (2002). Antioxidant enzymes in the honey bee. *Apidologie*, *33*(1), 3-14. <https://doi.org/10.1051/apido:2001001>
- Williams, J. B., Roberts, S. P., & Elekonich, M. M. (2008). Age and natural metabolically-intensive behavior affect oxidative stress and antioxidant mechanisms. *Experimental Gerontology*, *43*(6), 538-549. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2008.02.001>
- Yang, H., Kang, M., Guo, X., & Xu, B. (2010). Cloning, structural features, and expression analysis of the gene encoding thioredoxin reductase 1 from *Apis cerana cerana*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, *156*(3), 229-236. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2010.04.003>
- Yao, P., Hao, L., Wang, F., Chen, X., Yan, Y., Guo, X., & Xu, B. (2013). Molecular cloning, expression and antioxidant characterisation of a typical thioredoxin gene (AccTrx2) in *Apis cerana cerana*. *Gene*, *527*(1), 33-41. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.05.062>
- Yao, P., Chen, X., Yan, Y., Liu, F., Zhang, Y., Guo, X., & Xu, B. (2014). Glutaredoxin 1, glutaredoxin 2, thioredoxin 1, and thioredoxin peroxidase 3 play important roles in antioxidant

defense in *Apis cerana cerana*. *Free Radical Biology and Medicine*, 68, 335-346. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.12.020>

Zhang, S., Li, Z., Nian, X., Wu, F., Shen, Z., Zhang, B., Zhang, Q., & Liu, X. (2015). Sequence analysis, expression profiles and function of thioredoxin 2 and thioredoxin reductase 1 in resistance to nucleopolyhedrovirus in *Helicoverpa armigera*. *Scientific Reports*, 5(1), 15531-15547. <https://doi.org/10.1038/srep15531>

Zhang, X. -H., & Weissbach, H. (2008). Origin and evolution of the protein-repairing enzymes methionine sulphoxide reductases. *Biological Reviews*, 83(3), 249-257. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2008.00042.x>

7 Seznam použitých zkratek

AmTrxR	thioredoxinreduktasa z <i>Apis mellifera</i>
APx	askorbátperoxidasa
BSA	hovězí sérový albumin
CAT	katalasa
CBB	Coomasie Brilliant Blue G250
DMSO	dimethylsulfoxid
DTNB	5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina
DmTrxR	thioredoxinreduktasa z <i>Drosophila melanogaster</i>
GPx	glutathionperoxidasa
GR	glutathionreduktasa
GSH	glutathion
GSSG	glutathiondisulfid
GST	glutathionS-transferasa
Msr	methioninsulfoxidreduktasa
RNS	reaktivní formy dusíku
RNR	ribonukleotidreduktasa
ROS	reaktivní formy kyslíku
SOD	superoxiddismutasa
TPx	thioredoxinperoxidasa
Trx	thioredoxin
TrxR	thioredoxinreduktasa