

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Antioxidační systém včely medonosné

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Pavel Stejskal
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Marek Petřivalský, Dr.
Rok:	2018

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

V Olomouci dne 14. 5. 2018

Poděkování

Tímto bych rád poděkoval doc. RNDr. Marku Petřivalskému, Dr. za odborné vedení, ochotu a cenné rady, které mi pomohly při vypracovávání této bakalářské práce. Také bych rád poděkoval Mgr. Jiřímu Danihlíkovi, Ph.D. za ochotné poskytnutí biologického materiálu a všem členům Katedry biochemie za přátelský přístup a příjemné prostředí.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Pavel Stejskal
Název práce	Antioxidační systém včely medonosné
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	doc. RNDr. Marek Petřivalský, Dr.
Rok obhajoby práce	2018

Abstrakt

Včela medonosná (*Apis mellifera*) je významný zástupce společenského hmyzu s nepostradatelnou rolí opylovače rostlin a producenta lidmi široce využívaných včelích produktů. V průběhu svého života jsou včely vystavovány řadě stresových faktorů, které mohou vést k rozvoji tzv. oxidačního stresu, tedy významnému zvýšení hladiny reaktivních forem kyslíku v organismu. Ačkoliv tyto reaktivní sloučeniny mají při fyziologických koncentracích funkci jako signální molekuly v komplexní buněčné signální síti, je potřeba regulovat jejich hladinu pomocí nízkomolekulárních antioxidantů (kyselina askorbová, vitellogenin, tokoferoly aj.) a antioxidačních enzymů (superoxiddismutasa, askorbátperoxidasa, katalasa aj.).

V teoretické části jsou shrnuty dostupné poznatky o neenzymovém i enzymovém vzniku reaktivních forem kyslíku, jejich katabolismu a funkci v signálních drahách hmyzu se zaměřením na včelu medonosnou. V neposlední řadě jsou zde shrnuty i poznatky o tématech oxidačního stresu a antioxidační ochrany, následuje přehled publikovaných metod detekce a kvantifikace antioxidačních enzymů v hmyzích buňkách.

V praktické části byly zavedeny metody spektrofotometrického stanovení aktivity superoxiddismutasy a askorbátperoxidasy ve vzorcích včel (hlava, hrudník, zadeček), tyto enzymy byly také detekovány pomocí diskontinuální elektroforézy v polyakrylamidovém gelu za nativních podmínek. Stejným způsobem byla elektroforeticky detekována také katalasa. Nejvyšší aktivita superoxiddismutasy byla detekována v hrudnicích, jež obsahují letové svaly spojené s vysokými metabolickými nároky při letu a tím i vyšší pravděpodobností vzniku reaktivních forem kyslíku.

Nejvyšší aktivita askorbátperoxidasy byla detekována v zadečcích. V této tělní části se nachází velká část trávicího ústrojí a vysoká enzymová aktivita může být vysvětlena ochranou před prooxidanty přijímanými z potravy či vznikajícími v průběhu trávení.

Klíčová slova	Včela medonosná, antioxidační systém, reaktivní formy kyslíku, superoxiddismutasa, askorbáperoxidasa
Počet stran	61
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Pavel Stejskal
Title	Antioxidant system of the honey bee
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Biochemistry
Supervisor	doc. RNDr. Marek Petřivalský, Dr.
The year of presentation	2018

Abstract

Honey bee (*Apis mellifera*) is an important representative of social insects with an essential role of a plant pollinator and producer of bee products widely used by humans. During their life, bees are exposed to a number of stress factors that can lead to the development of so-called oxidative stress, a significant increase in the level of reactive oxygen species in the organism. Although these reactive compounds are present at physiological concentrations as signal molecules in the complex cell signal network, it is necessary to regulate their level with low-molecular antioxidants (ascorbic acid, vitellogenin, tocopherols, etc.) and antioxidant enzymes (superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, catalase etc.).

The theoretical part of this Bachelor thesis summarises available knowledge about non-enzymatic and enzymatic formation of reactive oxygen species, their catabolism and function in insect signaling pathways with focus on honey bees. This part includes also a summary of actual knowledge related to topics of oxidative stress and antioxidant protection, followed by an overview of published methods of detection and quantification of antioxidant enzymes in insect cells.

In the experimental part methods of spectrophotometric determination of superoxide dismutase and ascorbate peroxidase activity in bee samples (head, thorax, abdomen) were implemented, these enzymes were also detected by discontinuous polyacrylamide gel electrophoresis under native conditions. Catalase was also detected electrophoretically under the same conditions. The highest activity of superoxide dismutase was detected in the thoraces, which includes the flight muscles associated with high metabolic demands during flight, and thus causing a higher probability of

reactive oxygen species formation. The highest activity of ascorbate peroxidase was detected in the abdomen. A large part of the digestive tract is present in this part of body and high enzyme activity can be explained by protection from prooxidants originating from food or from prooxidants that arise during food digestion.

Keywords	Honey bee, antioxidant system, reactive oxygen species, superoxid dismutase, ascorbate peroxidase
Number of pages	61
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1	Úvod	12
2	Současný stav řešené problematiky	14
2.1	Vznik reaktivních forem kyslíku	14
2.1.1	Neenzymové	14
2.1.1.1	Mitochondrie	14
2.1.1.1.1	Komplex I	15
2.1.1.1.2	Komplex III	16
2.1.2	Enzymové	16
2.1.2.1	Oxidační vzplanutí	16
2.1.2.2	Cytochromy P450	17
2.1.2.3	Xantinoxidasa	18
2.2	Katabolismus reaktivních forem kyslíku	19
2.2.1	Antioxidační enzymy	19
2.2.1.1	Primární antioxidační enzymy	19
2.2.1.1.1	Superoxiddismutasa (EC 1. 15. 1. 1)	19
2.2.1.1.2	Katalasa (EC 1.11.1.6)	20
2.2.1.1.2.1	Monofunkční katalasy	20
2.2.1.1.2.2	Katalasy-peroxidasy	21
2.2.1.1.2.3	Katalasy obsahující mangan	21
2.2.1.1.3	Glutathionperoxidasa (GPX, EC 1.11.1.9)	22
2.2.1.1.4	Askorbátperoxidasa (APX, EC 1.11.1.11)	22
2.2.1.2	Sekundární antioxidační enzymy	23
2.3	Funkce reaktivních forem kyslíku v signálních drahách hmyzu	24
2.3.1	NF- κ B transkripční faktory	24
2.3.1.1	Vliv reaktivních forem kyslíku na aktivaci NF- κ B	24
2.3.1.2	Přímá regulace NF- κ B vlivem reaktivních forem kyslíku	26
2.3.2	Redox-dependentní systémová reakce hmyzu na poranění	26
2.3.3	Transkripční faktor CIF	28
2.4	Oxidační stres a antioxidační ochrana u hmyzu	29
2.4.1	Oxidační stres	29
2.4.2	Antioxidační ochrana	29
2.4.2.1	Kyselina askorbová a glutathion	30
2.4.2.2	Tokoferoly (vitamín E)	31
2.4.2.3	Karotenoidy	31
2.4.2.4	Vitellogenin	31

2.5	Přehled publikovaných metod stanovení aktivit hmyzích antioxidačních enzymů	32
2.5.1	Superoxiddismutasa	32
2.5.2	Asorbátperoxidasa	33
2.5.3	Katalasa	33
3	Experimentální část	35
3.1	Materiál	35
3.1.1	Biologický materiál	35
3.1.2	Chemikálie	35
3.1.3	Přístrojové vybavení	36
3.2	Metody	37
3.2.1	Spektrofotometrické stanovení koncentrace proteinů	37
3.2.2	Příprava vzorků pro spektrofotometrické stanovení aktivity superoxiddismutasy	37
3.2.3	Spektrofotometrické stanovení aktivity superoxiddismutasy	38
3.2.4	Příprava vzorků pro spektrofotometrické stanovení aktivity askorbátperoxidasy	38
3.2.5	Spektrofotometrické stanovení aktivity askorbátperoxidasy	38
3.2.6	Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za nativních podmínek – příprava gelu a elektrodového pufru	39
3.2.7	Detekce proteinů v polyakrylamidovém gelu koloidním CBB G-250	40
3.2.8	Detekce aktivity superoxiddismutasy v polyakrylamidovém gelu	40
3.2.9	Detekce aktivity katalasy v polyakrylamidovém gelu	40
3.2.10	Detekce aktivity askorbátperoxidasy v polyakrylamidovém gelu	41
3.2.11	Zpracování dat	41
4	Výsledky a diskuze	42
4.1.1	Spektrofotometrické stanovení aktivity komerční superoxiddismutasy	42
4.1.2	Spektrofotometrické stanovení aktivity superoxiddismutasy ve vzorcích včel	42
4.1.3	Spektrofotometrické stanovení aktivity askorbátperoxidasy ve vzorcích včel	43
4.1.4	Testování vlivu teplotního stresu včel na aktivitu superoxiddismutasy a askorbátperoxidasy	45
4.1.4.1	Spektrofotometrické stanovení aktivity superoxiddismutasy ve vzorcích stresovaných včel	45
4.1.4.2	Spektrofotometrické stanovení aktivity askorbátperoxidasy ve vzorcích stresovaných včel	46

4.1.5	Detekce aktivity komerční superoxiddismutasy v polyakrylamidovém gelu	48
4.1.6	Detekce aktivity superoxiddismutasy ve vzorcích včel v polyakrylamidovém gelu	49
4.1.7	Detekce aktivity katalasy ve vzorcích včel v polyakrylamidovém gelu	49
4.1.8	Detekce aktivity askorbátperoxidasy v polyakrylamidovém gelu	50
5	Závěr	52
6	Literatura	53
7	Seznam použitých zkratk	61

Cíle práce

- Vypracovat literární rešerši shrnující dostupné poznatky o složkách a funkci enzymových a neenzymových složek antioxidačního systému hmyzu, se zaměřením na včelu medonosnou (*Apis mellifera*)
- Zavedení metody stanovení aktivity vybraných antioxidačních enzymů (superoxid dismutasa, askorbátperoxidasa)
- Studium změn aktivit antioxidačních enzymů po vystavení dospělých včel stresovým faktorům v laboratorních podmínkách

1 Úvod

Včela medonosná (*Apis mellifera*) je významný zástupce společenského hmyzu s nepostradatelnou rolí opylovače rostlin a producenta lidmi široce využívaných včelích produktů, jako je například med, vosk či propolis. V průběhu svého života jsou včely často vystavovány řadě stresových faktorů, mezi něž patří například infekce patogenními viry a bakteriemi, napadení parazity, zásahy včelaře do včelstev během sezóny a v neposlední řadě také xenobiotika pocházející z pesticidů nebo průmyslové činnosti člověka. Důsledkem vystavení včel těmto stresovým faktorům vede k rozvoji tzv. oxidačního stresu, tedy významného zvýšení hladiny reaktivních forem kyslíku (ROS, z angl. termínu „reactive oxygen species“) v organismu (Even *et al.*, 2012; Kodrík *et al.*, 2015).

Jako reaktivní formy kyslíku označujeme chemicky vysoce reaktivní sloučeniny kyslíku, které lze rozlišit na volné radikály s jedním či více nepárovými elektrony a neradikálové formy sdílející jejich nepárové elektrony (Kodrík *et al.*, 2015). Řadíme mezi ně například superoxidový anionradikál ($O_2^{\cdot-}$), hydroxylový radikál ($\cdot OH$), hydroperoxylový radikál (HO_2^{\cdot}) a peroxid vodíku H_2O_2 . Zmíněné chemické sloučeniny můžeme dělit na primární, jejichž koncentrace je enzymaticky regulována (superoxiddismutasa (SOD), katalasa (CAT)) a mezi něž řadíme například superoxidový anionradikál ($O_2^{\cdot-}$), a sekundární, které nejsou příliš dobře kontrolovány a které vznikají interakcí s jinými molekulami či přechodnými kovy, příkladem je hydroxylový radikál ($\cdot OH$) (Weidinger a Kozlov, 2015).

Vznik reaktivních forem kyslíku v mitochondriích, peroxisomech či chloroplastech je pevně spjatý s aerobními organismy, které využívají procesy, jako je dýchání a fotosyntéza, během nichž vznikají částečnou redukcí molekuly kyslíku. Ke vzniku ROS dochází i za fyziologických podmínek různými enzymovými i neenzymovými reakcemi. Jejich hladina musí být udržována v nízkých koncentracích, pokud dojde k jejich zvýšené produkci nebo jsou nedostatečně odbourávány, zvýší se koncentrace ROS v organismu. Zvýšené hladiny reaktivních forem kyslíku v organismu pak vedou k oxidačnímu poškození proteinů, lipidů a nukleových kyselin. Tyto významné makromolekuly pak ztrácí své charakteristické funkce, což se může negativně odrážet na organismu procesem stárnutí, karcinogenezí nebo buněčnou smrtí (Weirich *et al.*, 2002; Weidinger a Kozlov, 2015).

Při fyziologické koncentraci figurují ROS v celé řadě procesů – biosyntéze hormonů, buněčné signalizaci v rámci aktivace obranné odpovědi buňky a v antimikrobiální ochraně (Veal *et al.*, 2007; Rada a Leto, 2008).

Mezi aerobní organismy řadíme mj. hmyz, který při letu vykazuje intenzivní energetický metabolismus, který je spojený se zvýšenou produkcí ROS. Ideálním organismem pro pozorování tohoto jevu je právě včela medonosná, v jejíchž létacích svalech lze očekávat vysokou míru oxidačního stresu (Williams *et al.*, 2008). V rámci prevence ochrany před oxidačním stresem vyvolaným reaktivními formami kyslíku vzniklými jednak touto cestou a jednak jako odpověď na stresové faktory uvedené výše, si aerobní organismy vyvinuly komplexní síť tvořenou nízkomolekulárními antioxidanty (kyselina askorbová, glutathion, tokoferoly aj.) a antioxidantními enzymy, které mají za cíl snižovat hladinu ROS v organismu. Příkladem antioxidantních enzymů je SOD, CAT či askorbátperoxidasa (APX)(Felton a Summers, 1995; Corona a Robinson, 2006).

Výzkumy spojené s hmyzem využívají studia modelových organismů, často například octomilky obecné (*Drosophila melanogaster*) či zástupců čeledi komárovitých (*Anopheles*), které jsou ve srovnání se včelami hlouběji prozkoumány. Předmětem studia této bakalářské práce je zkoumat antioxidantní systém včely medonosné a získat tak hlubší znalosti o významné součásti metabolismu tohoto organismu.

2 Současný stav řešené problematiky

2.1 Vznik reaktivních forem kyslíku

Rozlišujeme enzymové a neenzymové zdroje ROS. Mezi neenzymové zdroje ROS patří zejména mitochondriální elektronový transportní řetězec, ionizující záření a působení těžkých kovů (např. Fe^{2+} či Cu^+) (Kodrík *et al.*, 2015). Včela medonosná se potýká s oxidačním stresem hlavně kvůli intenzivní svalové námaze způsobené létáním, které ve srovnání s klidovým stavem včely až stonásobně zrychluje metabolismus. Proto dochází k tvorbě velkého množství ROS v mitochondriích létacích svalů (Suarez *et al.*, 1999). Reakce H_2O_2 s ionty přechodných kovů jako jsou železo či měď nazýváme Fentonova reakce a produkty této reakce jsou kromě oxidovaného atomu kovu (Fe^{3+} či Cu^{2+}) také hydroxylový radikál a hydroxidový anion. Vlivem ionizujícího záření může být hydroxylový radikál v přítomnosti kyslíku přeměněn na H_2O_2 a organické peroxidy (Biaglow *et al.*, 1992; Chiu *et al.*, 1993).

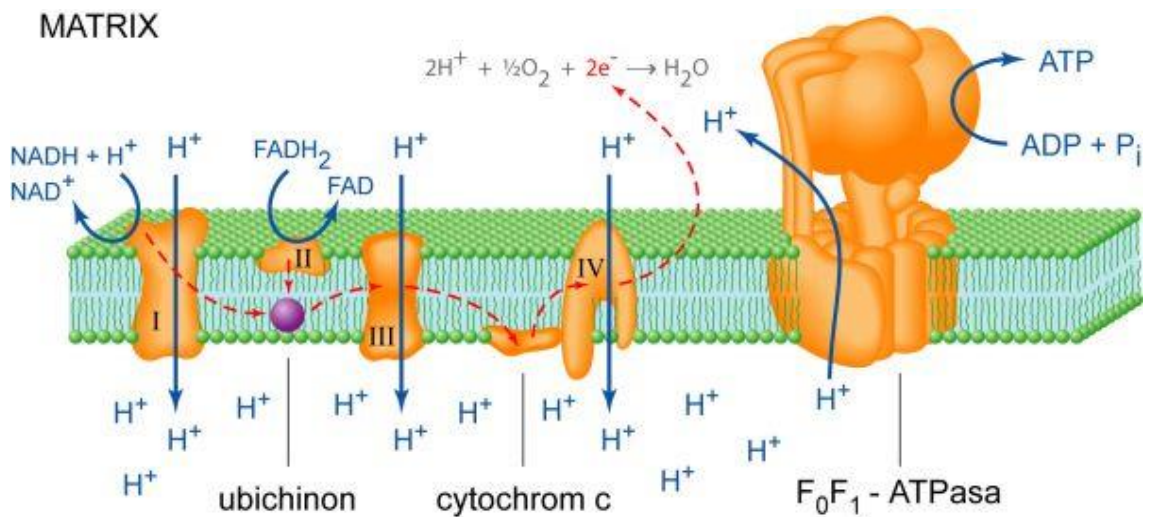
Naproti tomu enzymové zdroje reaktivních forem kyslíku jsou především NADPH oxidasy (EC 1.6.3.1) lokalizované v cytoplazmatické membráně fagocytárních buněk (Racek a Holeček, 1999), cytochromy P450 (EC 1.14.14.1) v membránových strukturách organel (Stiborová *et al.*, 1999) a xantinoxidasa (EC 1.17.3.2), jejíž lokalizaci demonstrovali Beard a Holtzman (1987) u octomilky obecné v peroxisomech.

2.1.1 Neenzymové

2.1.1.1 Mitochondrie

Mitochondrie jsou důležité buněčné organely aerobních živočichů generující chemickou energii pro buňku. Nedílnou součástí mitochondrií je dýchací řetězec, v němž probíhají redoxní reakce a přenos protonů do mezimembránového prostoru. Vzniká tak protonový gradient, jenž pohání ATPasu při syntéze ATP, což je důležitý zdroj energie pro většinu buněčných aktivit. V rámci dýchacího řetězce dochází k přenosu 4 elektronů na molekulu kyslíku, který je redukován na vodu (Alberts *et al.*, 1998). Z celkového množství 1 – 3 % elektronů transportovaných skrze elektronový transportní řetězec vybočuje z tohoto procesu a interakcí s molekulou kyslíku vede k tvorbě superoxidového anionradikálu (Fridovich, 2004).

Součástí elektronového transportního řetězce jsou komplexy zakotvené ve vnitřní mitochondriální membráně (Obr. 1), jedná se o NADH-Q oxidoreduktasu (komplex I), sukcinát-Qreduktasu (komplex II), Q-cytochrom-c-oxidoreduktasu (komplex III)



MEZIMEMBRÁNOVÝ PROSTOR

Obrázek 1: Schéma mitochondriálního dýchacího řetězce. I, II, III a IV označují jednotlivé membránové komplexy, elektrony z molekuly NADH jsou přenášeny přes redoxní centra komplexu I na koenzym Q. Ten se redukuje a spolu s přenosem protonů z matrix do mezimembránového prostoru předává elektrony na komplex III. Následuje přenos elektronů na cytochrom c a komplex IV následně katalyzuje oxidaci čtyř po sobě redukovaných molekul cytochromu c za současné redukce molekuly O_2 a vzniku vody (Převzato z: Kodíček *et al.*, 2015).

a cytochrom-c-oxidasu (komplex IV). Elektrony z molekuly NADH jsou přenášeny přes redoxní centra komplexu I na koenzym Q (ubichinon), který se tak redukuje a spolu s přenosem protonů (H^+) z matrix do mezimembránového prostoru předává elektrony dále na komplex III. Vzniklý elektrochemický potenciál je dále využit pro tvorbu ATP za katalýzy ATP syntasou (Kodíček *et al.*, 2015). Bioenergetické vlastnosti mitochondrií, jejich vysoký kyslíkový obrat a přítomnost jejich vlastní SOD naznačují, že jsou tyto organely aktivním intracelulárním zdrojem ROS (Nohl *et al.*, 2003). V souvislosti s produkcí kyslíkových radikálů je vhodné se zaměřit na komplex I a komplex III (Beyer, 1992; Muller *et al.*, 2004). Příčinami této produkce jsou hlavně snížená aktivita komplexu způsobená genetickými defekty (Pitkänen a Robinson, 1996), změny membránového potenciálu (Liu *et al.*, 2002), a inhibitory blokující elektronový transportní řetězec (Chen *et al.*, 2003).

2.1.1.1 Komplex I

Kofaktor ubichinonreduktasy flavinmononukleotid (FMN) přijímá elektrony z NADH a podíl jeho redukované formy se odvíjí od poměru NADH/NAD^+ . Produkce ROS vzniká tehdy, dojde-li k reakci kyslíku s redukovaným FMN. V případě inhibice

elektronového transportního řetězce inhibitorem komplexu I rotenonem (flavonoid používaný mj. jako insekticid) dochází k hromadění NADH v matrix a ke zvýšení poměru NADH/NAD⁺, což má za následek produkci O₂⁻· do matrix. Protože se jedná o nabitou částici, O₂⁻· neprochází membránou, průchod je možný až po přeměně na H₂O₂, který se tak dostává do extramitochondriálního prostředí (Muller *et al.*, 2004).

V případě zpětného transportu elektronů z komplexu II na komplex I přes ubichinon při oxidaci sukcinátu dochází k nadprodukcí O₂⁻· na komplexu I. Tento děj je podmíněn vysokým protonovým gradientem, jedná se o případ, kdy neprobíhá produkce ATP (Liu *et al.*, 2002).

2.1.1.1.2 Komplex III

Tvorba O₂⁻· na komplexu III je spjata se semichinonovým radikálem (QH·, chinonová struktura ubichinonu po přijetí jednoho elektronu a jednoho protonu), konkrétně zpomalením či zastavením přenosu elektronu ze semichinonu (vázaného ve vazebném místě Q₀ komplexu III) na ubichinon. Příčinou zpomalení je vysoký membránový potenciál, zastavení elektronového přenosu je způsobeno antimycinem A (inhibitor Q_i vazebného místa komplexu III používaný jako fungicid a insekticid). V obou případech dochází k delšímu setrvání semichinonového radikálu na vazebném místě Q₀ a tím se zvyšuje riziko přenesení elektronu na molekulu kyslíku (Raha *et al.*, 2000).

2.1.2 Enzymové

2.1.2.1 Oxidační vzplanutí

Imunitní reakci hmyzu tvoří dvě těsně propojené složky – buněčná a humorální odezva (Hultmark, 1993; Hoffmann, 1995). Buněčnou odpověď zprostředkovávají hemocyty (hlavní imunitní buňky bezobratlých) pomocí fagocytózy, enkapsulace a nodulace. Humorální obranu zajišťují efektorové molekuly jako antimikrobiální peptidy, melanin, produkty fenoloxidasové kaskády a reaktivní formy kyslíku a dusíku (Browne *et al.*, 2013; Borba *et al.*, 2015). Mezi hlavní enzymy katalyzující vznik volných radikálů patří NADPH-oxidasu nacházející se v plasmatické membráně fagocytů, která katalyzuje vznik superoxidového anionradikálu jedoelektronovou redukcí kyslíku (Racek a Holeček, 1999):

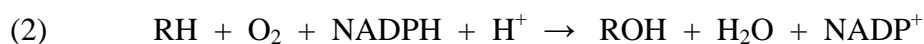


Ben-Ami (2011) popsal iniciaci fagocytózy u octomilky navázáním příslušných konzervovaných mikrobiálních motivů na receptory na povrchu plasmocytů (typ hemocytů popsaný ve zmíněné práci u octomilky). Takto rozpoznané patogeny jsou zachyceny a následně fagocytovány (Tojo *et al.*, 2000; Ben-Ami, 2011). Zachycení patogenu fagocytární buňkou stimuluje aktivitu membránově vázané NADPH oxidasy, která díky přemístění elektronů z cytosolární NADH k extracelulárnímu kyslíku produkuje superoxidy (které mohou být dále přeměňovány na účinnější metabolity – H₂O₂, hydroxylový radikál či peroxynitrid) k jejich usmrcení (Racek a Holeček, 1999). V místě infekce však může dojít k uvolnění enzymů a místnímu poškození tkání (Baggiolini a Wymann, 1990).

2.1.2.2 Cytochromy P450

Cytochromy P450 představují skupinu enzymů, které se obecně podílejí na metabolismu endogenních látek a malých hydrofobních xenobiotik, které transformují na polárnější produkty, což umožňuje jejich vyloučení a zamezení akumulace (Stiborová *et al.*, 1999). Katalyzují rozmanité reakce – mj. hydroxylaci, sulfoxidaci či epoxidaci (Bernhardt, 1995). Tyto enzymy obsahují porfyrinové jádro s atomem železa jako centrálním atomem (Estabrook, 2005; Coon, 2005), jehož ligandem je mj. thiolátový anion pocházející z cysteinu. Dalším ligandem se v probíhající reakci stává atom kyslíku molekuly vody. V rámci eukaryot se vyskytují v membránových strukturách mitochondrií a endoplazmatického retikula (Lamb a Waterman, 2013).

Cytochromy P450 katalyzují monooxygenasové reakce prostřednictvím propojení s enzymem lokalizovaným v endoplazmatickém retikulu – NADPH:cytochrom P450 reduktasou či dalšími mitochondriálními enzymy (Stiborová *et al.*, 1999). Funkcí cytochromů P450 je katalýza monooxygenasové reakce, během níž dochází k začlenění jednoho atomu molekuly kyslíku do substrátu, zatímco druhý atom kyslíku se redukuje na vodu (Hanukoglu, 2006):

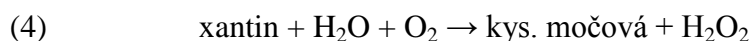
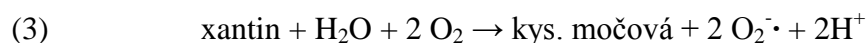


V těchto reakcích se nejdříve přenášejí elektrony z NADPH buď na NADPH:cytochrom P450 reduktasu v endoplazmatickém retikulu nebo na ferredoxinreduktasu a Fe-S protein v mitochondriích a poté na cytochromy P450, které ve své redukované formě aktivují molekulu kyslíku a jak je popsáno výše, jeden kyslíkový atom je začleněn do substrátu a druhý atom kyslíku se redukuje na vodu

(Stiborová *et al.*, 1999). V případě, že je část elektronů přenášena na jiné akceptory, například molekulu kyslíku, dochází ke vzniku kyslíkových radikálů (Ding *et al.*, 1991; Kohno *et al.*, 2005).

2.1.2.3 Xantinoxidasa

Xantinoxidasa (XO) je enzym obsahující molybden, dvě FeS centra a kofaktor FAD a katalyzující oxidaci mnohých substrátů, mezi něž patří puriny hypoxantin a xantin, z nichž vzniká kyselina močová. Jedná se o životně důležitou reakci urikotelních živočichů, mezi které patří také suchozemský hmyz (Anderson a Patton, 1954). Existuje také řada akceptorů elektronů, které interagují s tímto enzymem - z hlediska vzniku ROS je vhodné zmínit především molekulu kyslíku (Gray, 1971), která vede ke vzniku superoxidových radikálů a H_2O_2 (Muraoka, 1967). XO je tedy dalším zdrojem radikálů odvozených od kyslíku, které vedou k oxidačnímu poškození živých tkání. Tento enzym katalyzuje reakce produkující superoxidový radikál nebo H_2O_2 (Lacy *et al.*, 1998):



2.2 Katabolismus reaktivních forem kyslíku

Jak bylo v předchozích řádcích popsáno, reaktivní formy kyslíku mohou v organismu vzniknout různými enzymovými a neenzymovými cestami. Zvýšené koncentrace ROS v důsledku jejich zvýšené produkce a nedostatečného či narušeného odbourávání nejsou pro organismus pozitivní, neboť ve větší míře poškozují důležité makromolekuly, jako jsou proteiny nebo nukleové kyseliny (Sohal a Weindruch, 1996). Je tedy zřejmé, že koncentrace ROS v organismu musí být regulována. Za účelem prevence vzniku oxidačního poškození si organismy vyvinuly sadu antioxidantních enzymů (Cadenas, 1989), které spolu s neenzymovými antioxidanty (např. kyselina askorbová, glutathion – viz 4. kapitola) zajišťují komplexní antioxidantní ochranu organismu (Felton a Summers, 1995; Corona a Robinson, 2006).

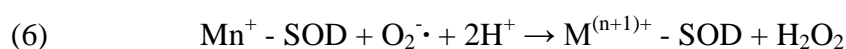
2.2.1 Antioxidanční enzymy

Obrana proti poškození organismu reaktivními formami kyslíku je zajišťována řetězovými reakcemi různých antioxidantů, z nichž enzymové antioxidanty dělíme na primární a sekundární. Primární antioxidantní enzymy (např. SOD, CAT, peroxidasy) působí na ROS přímo, oproti tomu sekundární (např. thioredoxinreduktasa) nepřímo přispívají k jejich katabolismu například recyklaci elektronových donorů (Corona a Robinson, 2006).

2.2.1.1 Primární antioxidantní enzymy

2.2.1.1.1 Superoxiddismutasa (EC 1. 15. 1. 1)

Metaloproteiny SOD patří mezi nejdůležitější části antioxidantních enzymových obranných systémů. Úlohou těchto enzymů je katalýza dismutace superoxidu na méně reaktivní a dále rozložitelnou sloučeninu H_2O_2 a kyslík. Tento děj vystihují reakce 5 a 6 níže ($M = Cu$ ($n = 1$) anebo Mn ($n = 2$))(Matoušková *et al.*, 2014):



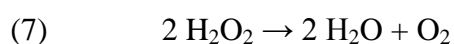
V současnosti jsou popsány čtyři odlišné izoformy SOD s různými kovovými kofaktory (Wolfe-Simon *et al.*, 2006). Dvě z nich mají ve své struktuře měď a zinek a jsou lokalizovány v cytoplasmatickém kompartmentu (CuZn-SOD nebo SOD1) nebo v extracelulárních prostorách (EC-SOD nebo SOD3). Homodimerní SOD1 má molekulovou hmotnost 32 kDa a homotetramerní SOD3 135 kDa. Třetí izoforma s manganem jako kofaktorem (Mn-SOD nebo SOD2) je homotetramer o molekulové

hmotnosti jednotlivých podjednotek 23 kDa a je lokalizován zejména v matrix mitochondrií (Zelko *et al.*, 2002). Čtvrtá izoforma Fe-SOD byla detekována u cyanobakterií a jiných prokaryot, stejně jako v plastidech některých rostlin (Okada *et al.*, 1979; Tsang *et al.*, 1991). Zcela nová izoforma Ni-SOD byla nalezena u bakterií rodu *Streptomyces*, jde o heterotetramer bez zřejmé sekvenční homologie ke známým Mn-SOD nebo Fe-SOD (Kim *et al.*, 1996).

Jednotlivé typy SOD lze rozlišit na základě příslušné citlivosti vůči následujícím sloučeninám. Kyanid inhibuje Cu,Zn-SOD, ale nikoliv Mn-SOD a Fe-SOD (Weisiger a Fridovich, 1973), dodecylsírán sodný (SDS) inhibuje Mn-SOD (Geller a Winge, 1983), diethyldithiokarbamát působí na Cu,Zn-SOD chelatací mědi (Kelner a Alexander, 1986), H₂O₂ s EDTA inaktivuje Fe-SOD a Cu,Zn-SOD (Hodgson a Fridovich, 1975), azid sodný inhibuje enzymy v následujícím pořadí: Cu,Zn-SOD < Mn-SOD < Fe-SOD (Misra a Fridovich, 1978).

2.2.1.1.2 Katalasa (EC 1.11.1.6)

CAT je enzym vyskytující se u většiny aerobních organismů zejména v peroxisomech, dále v mitochondriích a endoplazmatickém retikulu (Hsieh a Hsu, 2013). Jedná se o tetramerní enzym o celkové molekulové hmotnosti 240 kDa, obsahující 4 stejné podjednotky o molekulové hmotnosti 60 kDa v tetraedrálním uspořádání. Zajišťuje rozklad dvou molekul H₂O₂ za vzniku vody a kyslíku (Matés *et al.*, 1999):

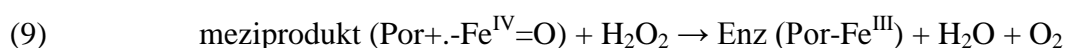
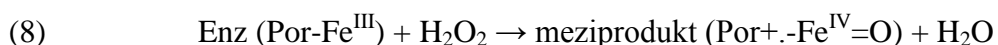


Tato zdánlivě jednoduchá reakce může být rozdělena do 2 kroků v závislosti na typu CAT. V současné době je dostupných více než 300 sekvencí pro CAT, které klasifikujeme do tří skupin – co do četnosti jde sestupně o: monofunkční CAT, CAT-peroxidasy a CAT obsahující mangan (Chelikani *et al.*, 2004). Poslední jmenovaná skupina zahrnuje v porovnání s předchozími dvěma nehemové CAT (Zámocký a Koller, 1999).

2.2.1.1.2.1 Monofunkční katalasy

Jedná se o největší podskupinu, jejíž členové se vyskytují téměř ve všech aerobních organismech – prokaryotních i eukaryotních. Žádná z těchto CAT však nebyla prozatím popsána v doméně *Archae*. Většinou se jedná o homotetramery s molekulovou hmotností 200-340 kDa se čtyřmi hemovými skupinami (Zámocký a Koller, 1999). Mechanismus degradace H₂O₂ je společný pro všechny CAT obsahující hem a zahrnuje

2 kroky – nejdříve jedna molekula peroxidu oxiduje hem na oxyferrylovou formu za současného odstranění jednoho oxidačního ekvivalentu ze železa a jednoho z porfyrinového kruhu za vzniku porfyrinového kationradikálu. Druhá molekula peroxidu slouží jako redukční činidlo takto vzniklého meziproductu za současné regenerace enzymu a vzniku molekuly vody a kyslíku. Popsaný děj popisují reakce 8 a 9 níže (Chelikani *et al.*, 2004):



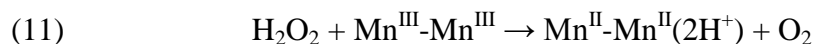
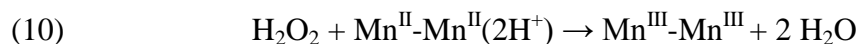
2.2.1.1.2.2 Katalasy-peroxidasy

CAT spadající do této skupiny se vyskytují ve všech třech doménách (bakterie, archea a eukaryota) (Levy *et al.*, 1992; Fraaije *et al.*, 1996). Molekulová hmotnost těchto většinou homodimerních enzymů se pohybuje mezi 120 a 340 kDa (Zámocký a Koller, 1999). Reakce rozkladu H_2O_2 probíhá v případě těchto CAT ve stejných dvou krocích popsaných u monofunkčních CAT, které jsou sice strukturně odlišné od CAT-peroxidasy, avšak taktéž mají ve své struktuře hem a rezidua v aktivním místě hrají zřejmě podobné role. Pro CAT-peroxidasy je však typické bifunkční chování, kdy v přítomnosti vhodného organického elektronového donoru a nízkých hladin H_2O_2 nabývá na významu peroxidasová reakce. V této reakci dochází k redukci meziproductu prostřednictvím dvou jednoelektronových přenosů z organických elektronových donorů (Chelikani *et al.*, 2004).

2.2.1.1.2.3 Katalasy obsahující mangan

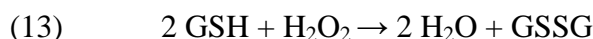
Skupina těchto CAT bývá také označována jako nehemové CAT. Oproti předchozím dvěma skupinám nejsou tak rozšířené, dosud byly popsány pouze u bakterií. Další odlišnost spočívá v tom, že CAT obsahující mangan nejsou inhibovány kyanidovými a nitridovými ionty (Zámocký a Koller, 1999). V případě bakterií *Thermus thermophilus* a *Lactobacillus plantarum* se jedná o 30kDa proteiny homohexamerní struktury s dimanganovým klastrem v katalytickém místě. Samotná katalyzovaná reakce probíhá taktéž ve dvou krocích. Dimanganový klastr je stabilní rovnocenně buď v oxidačním čísle $\text{Mn}^{\text{II}}\text{-Mn}^{\text{II}}$ nebo $\text{Mn}^{\text{III}}\text{-Mn}^{\text{III}}$, tyto enzymy jsou tedy izolovány jako směs těchto dvou stavů. V důsledku toho nelze hovořit o dočasném pořadí oxidovaných a redukovaných stavů. Je-li zjištěn stav 2,2, je H_2O_2 oxidačním činidlem (reakce 11

níže), v případě stavu 3,3 je H₂O₂ redukčním činidlem (reakce 12 níže)(Chelikani *et al.*, 2004):



2.2.1.1.3 Glutathionperoxidasa (GPX, EC 1.11.1.9)

Glutathionperoxidasy je obecné označení pro rodinu mnoha izoenzymů (ovšem glutathionperoxidasovou aktivitu vykazují také některé izoenzymy z rodiny glutathiontransferas (EC 2.5.1.18), což ve své práci uvádějí Weinhold *et al.* (1990) a Veal *et al.* (2002)), které katalyzují redukci H₂O₂ nebo organických hydroperoxidů na vodu nebo příslušný alkohol za použití redukovaného glutathionu (GSH) jako elektronového donoru (Margis *et al.*, 2008), který je převeden na oxidovanou formu (GSSG, reakce 13 níže)(Cotgreave *et al.*, 1988):



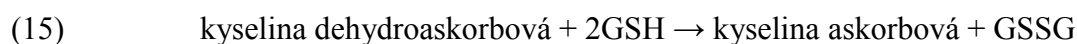
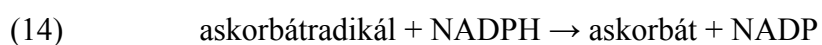
Někteří živočichové disponují selen-dependentní glutathionperoxidasovou aktivitou, kdy kofaktorem enzymu je selen (Margis *et al.*, 2008). Výzkumy ukazují na absenci tohoto enzymu u hmyzu (Smith a Shrift, 1979; Ahmad, 1992; Corona a Robinson, 2006), příčinu je možné hledat z evolučního hlediska, protože závislost býložravého hmyzu na rostlinách nevyžadující tento prvek mohl vést k tomu, že tento hmyz není na selenu závislý (Ahmad *et al.*, 1989).

2.2.1.1.4 Askorbátperoxidasa (APX, EC 1.11.1.11)

Kvůli absenci selen-dependentní glutathionperoxidasy u hmyzu (Mathews *et al.*, 1997) a nedostatečné účinnosti CAT při nízkých koncentracích H₂O₂ (relativně vysoká hodnota K_m pro H₂O₂)(Ahmad, 1992) hmyz využívá jiné prostředky pro udržení peroxidů na bezpečné úrovni. APX redukuje H₂O₂ díky redukční síle získané oxidací askorbátu jako donoru elektronů a to především u savců a rostlin, ale i u hmyzu (Mathews *et al.*, 1997).

V larvách *Helicoverva larvae* byla detekována aktivita APX, přičemž bylo zjištěno, že u tohoto organismu askorbát není jediným možným *in vitro* zdrojem elektronů. Přestože afinita enzymu vůči jiným potenciálním elektronovým donorům (NADPH, glutathion) není známa, při stejných koncentracích těchto donorů byla aktivita enzymu nejvyšší v případě askorbátu. Významný krok regenerace oxidovaných elektronových

donorů je u *H. Zea* zajišťován enzymy askorbátradikálreduktasou (ARR, EC 1.6.5.4) nebo dehydroaskorbátreduktasou (DHAR, EC 1.8.5.1)(Mathews *et al.*, 1997). ARR katalyzuje reakci 14 níže a DHAR reakci 15 níže (Felton a Summers, 1995):



Aktivita APX u *H. zea* s modelovými lipidovými peroxidy a relativně vysoká aktivita v tukových tkáních naznačují potenciální význam tohoto enzymu při odstraňování lipidových peroxidů. Neméně důležitý je také výskyt aktivity APX v trávicí soustavě s možným uplatněním při odstraňování požitých peroxidů a peroxidů vzniklých ve střevě během trávení (Mathews *et al.*, 1997).

2.2.1.2 Sekundární antioxidační enzymy

Mezi sekundární antioxidační enzymy zahrnujeme takové, které se nepřímo podílejí na antioxidační ochraně organismu doplňujícími reakcemi zefektivňující tuto ochranu, patří mezi ně thioredoxinreduktasa, která recykluje thioredoxin (TRX) a glutathion přenosem redukčních ekvivalentů z NADPH či methioninsulfoxidreduktasy podílejší se na opravách oxidovaných proteinů katalýzou TRX-dependentní redukce methioninsulfoxidu na methionin (Corona a Robinson, 2006). Na antioxidační ochraně se nepřímo podílí také glutathionreduktasa katalýzou recyklace oxidovaného GSSG na redukovaný GSH (Felton a Summers, 1995).

2.3 Funkce reaktivních forem kyslíku v signálních drahách hmyzu

Jak již bylo popsáno výše, typickým rysem ROS je jejich schopnost negativně působit na důležité buněčné složky, jako jsou proteiny či nukleové kyseliny. Není proto divu, že původně byly považovány pouze za toxické vedlejší produkty aerobního organismu odstraňované antioxidanty a antioxidantními enzymy. Nyní jsou však uznávány jako významné signální molekuly v komplexní buněčné signální síti (Mittler *et al.*, 2011). Úloha volných radikálů u hmyzu je dobře známa při eliminaci patogenů, ale jejich možná funkce jako signálních molekul aktivujících imunitní odpověď není tak dobře prozkoumána (Moreno-García *et al.*, 2014). Dostupné poznatky o funkci ROS v signálních drahách hmyzu budou nyní podrobněji rozebrány.

2.3.1 NF-κB transkripční faktory

NF-κB (nuclear factor-κB) proteiny jsou rodina transkripčních faktorů, které mají klíčovou roli v imunitě, proliferaci buněk, jejich diferenciaci a přežívání. Jsou aktivovány fosforylačně-indukovanou proteosomální degradací inhibitoru IκB, který zachovává neaktivní dimery NF-κB v cytosolu v nestimulovaných buňkách. Rozklad inhibitoru umožní těmto transkripčním faktorům vstup do jádra a regulaci přepisu genů (Oeckinghaus a Ghosh, 2009).

Zapojení H₂O₂, typického zástupce ROS, v aktivaci akutní fáze imunitní odpovědi prostřednictvím NF-κB je dobře zdokumentováno (Gloire *et al.*, 2006). Reaktivní formy kyslíku interagují s NF-κB několika způsoby, ačkoliv popis těchto interakcí je poněkud složitý kvůli buněčné specifitě. Transkripce genů závislých na NF-κB ovlivňuje hladinu ROS v buňce a naopak aktivita těchto transkripčních faktorů je regulována hladinou ROS (Morgan a Liu, 2011).

Bylo zjištěno, že ROS uvolněné v návaznosti na metabolický stres buněk aktivují NF-κB faktory kromě savců i v mouchách (Gallucci a Matzinger, 2001). Ve většině případů exprese cílových genů NF-κB podporuje buněčné přežití (Morgan a Liu, 2011), i když existují výjimky, kdy NF-κB přispívá k buněčné smrti (Perkins a Gilmore, 2006). Není tedy překvapující, že ROS by modulovaly NF-κB odpovědi a jejich cílové geny by oslabovaly účinky ROS k podpoře přežití (Morgan a Liu, 2011).

2.3.1.1 Vliv reaktivních forem kyslíku na aktivaci NF-κB

Zaměříme-li se na způsoby, jimiž ROS ovlivňují aktivitu NF-κB, je nutno dodat, že přesný popis příspěvku ROS k signalizaci je obtížný, neboť ROS mnohdy fungují na

více místech dané cesty a někdy i protichůdně (Morgan a Liu, 2011). Příkladem je stimulace NF- κ B ROS v cytoplazmě v kontrastu s inhibicí aktivity NF- κ B v jádře (Kabe *et al.*, 2005). ROS ovlivňují signalizaci reakcí s cysteinem zejména v katalytickém místě enzymu, kde se nachází v thiolátové formě (Paulsen a Carroll, 2005). Příkladem je inaktivace tyrosinfosfatasy oxidací katalytických cysteinů vlivem ROS (Nakashima *et al.*, 2002; Groen *et al.*, 2005). Oxidace cysteinů vedoucí ke kyselině sulfenové je obvykle reverzibilní buněčný antioxidační mechanismus. Další oxidace na kyselinu sulfinovou a následně na kyselinu sulfonovou však ireverzibilně inaktivuje fosfatasy (Groen *et al.*, 2005).

Nestabilní kyselina sulfenová může reagovat s buněčným glutathionem, což vlivem vznikající disulfidové vazby vede k S-glutathionovanému proteinu, který je inaktivní. V případě, že je v těsné blízkosti oxidovaného cysteinu ve formě kyseliny sulfenové jiný cystein, může dojít k tvorbě intramolekulární disulfidové vazby a tím ke změně konformace proteinu, což má za následek potlačení či iniciaci aktivity proteinu (Morgan a Liu, 2011).

Přímá oxidace heterodimeru NF- κ B vlivem ROS zamezuje vazbě na DNA (Toledano a Leonard, 1991). Velmi citlivý na oxidaci je Cys-62 v Rel homologní doméně (RHD) důležité mj. pro dimerizaci či vazbu na DNA, jeho oxidace tedy inhibuje vazbu na DNA (Matthews *et al.*, 1992; Toledano *et al.*, 1993). Jaderný enzym Ref-1 může opravit tento oxidační krok a obnovit vazbu NF- κ B na DNA (Nishi *et al.*, 2002) patrně v interakci s TRX1 (Hirota *et al.*, 1997; Ando *et al.*, 2008).

ROS působí nepřímo na vazbu NF- κ B na DNA i regulací fosforylace RelA (jednoho ze dvou proteinů heterodimeru NF- κ B) na Ser-276, což je nutné pro expresi podskupiny genů závislých na NF- κ B (Nowak *et al.*, 2008). Fosforylovaný Ser-276 je nezbytný pro interakci RelA s transkripčními koaktivátory CBP/p300 (CBP, z angl. termínu „CREB-binding protein“)(Zhong *et al.*, 2002), stejně jako s pozitivním elongačním faktorem b (Nowak *et al.*, 2008). PKAc (katalytická podjednotka cAMP–dependentní proteinkinasy) zprostředkovává fosforylaci Ser-276 (Zhong *et al.*, 1998; Zhong *et al.*, 2002) a předpokládá se, že tento krok závisí na ROS na základě několika důvodů (Gloire a Piette, 2009), mezi které patří zjištění, že antioxidační látky inhibují fosforylaci Ser-276 a CBP/p300 vazbu (Jamaluddin *et al.*, 2007).

2.3.1.2 Přímá regulace NF-κB vlivem reaktivních forem kyslíku

H₂O₂ exogenního původu reguluje aktivaci NF-κB skrze alternativní fosforylaci inhibitoru IκBα, který je obvykle fosforylován na serinech 32 a 36, což vede k jeho ubikvitinaci a degradaci. H₂O₂ však způsobuje fosforylaci IκBα na tyrosinu 42 či jiném a důležitý krok degradace IκBα nemusí být tedy v rámci procesu aktivace NF-κB naplněn (Schieven *et al.*, 1993; Canty *et al.*, 1999; Schoonbroodt *et al.*, 2000; Takada *et al.*, 2003). Přestože většina inhibičního účinku ROS na NF-κB v kontextu stability IκBα byla přisuzována inhibici proteasomu (Wu *et al.*, 2009), bylo také prokázáno, že modifikace IκBα vlivem ROS vede k inhibici aktivace NF-κB glutathionylací na cysteinu 189, což zabrání fosforylačním účinkům a následné degradaci (Kil *et al.*, 2008).

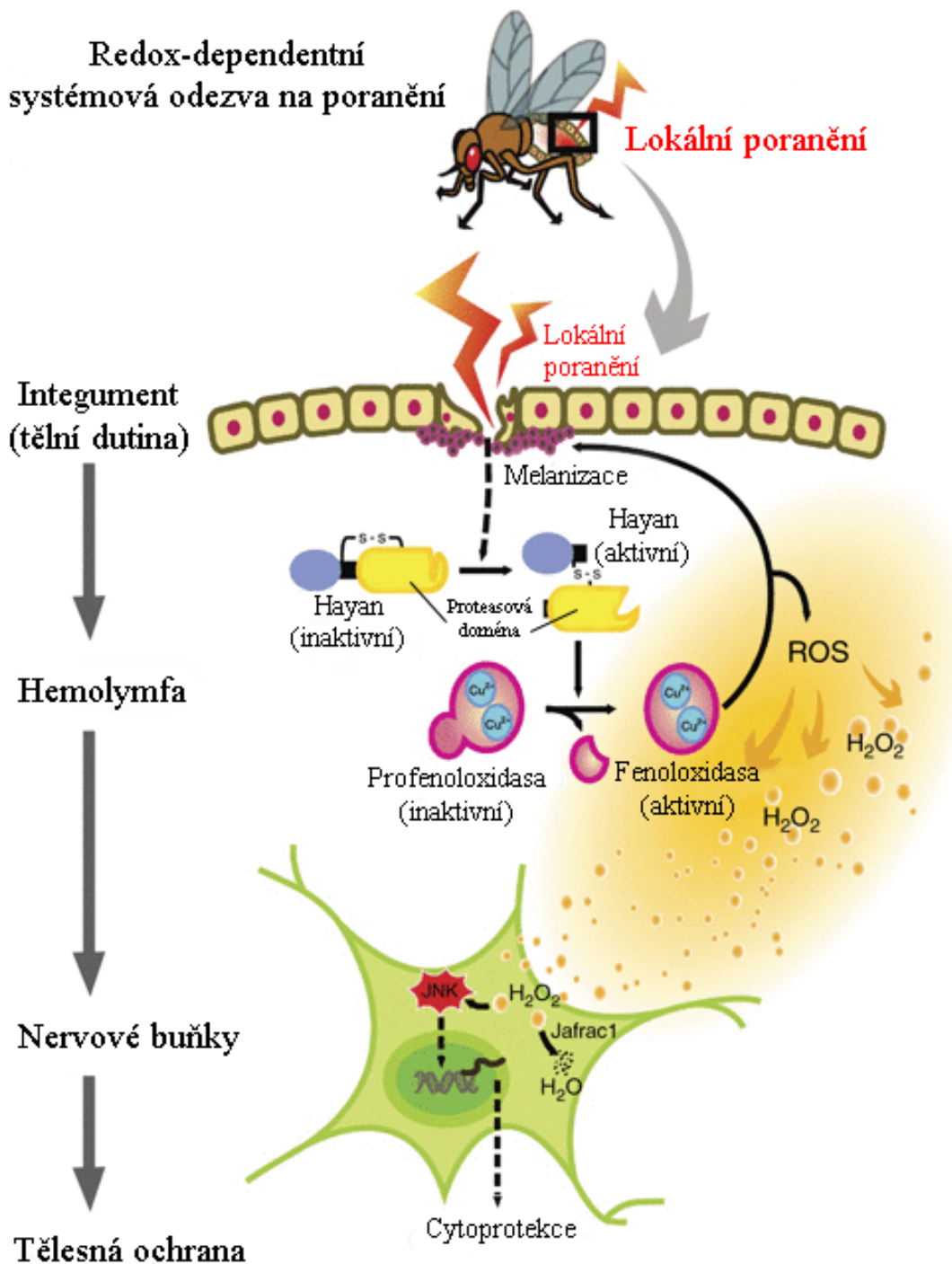
H₂O₂ může dále ovlivňovat NF-κB signalizaci skrze inaktivaci katalytické podjednotky IKK, tedy kinasy fosforylující IκB (Korn *et al.*, 2001; Byun *et al.*, 2002; Panopoulos *et al.*, 2005; Reynaert *et al.*, 2006) oxidací IKKβ na cysteinu 179 neboť byla zjištěna jeho S-glutathionylace po vystavení ROS, což má za následek inaktivaci kinasové aktivity a omezení NF-κB signalizace (Reynaert *et al.*, 2006).

2.3.2 Redox-dependentní systémová reakce hmyzu na poranění

Systémová reakce na poranění je základní biologický jev vyskytující se u mnohobuněčných organismů a je charakteristický snahou odolat fyzickému traumatu na systémové úrovni, tedy i v nepoškozených tkáních. V případě octomilky bylo zjištěno, že tato systémová odpověď je závislá na serinové protease zvané Hayan (Nam *et al.*, 2012), která je v hemolymfě aktivována při poranění integumentu a aktivuje fenoloxidasovou kaskádu spojenou s produkcí ROS jako např. H₂O₂ (Nappi a Vass, 1993), který aktivuje JNK-dependentní (JNK, tedy c-Jun N-terminální kinasy – rodina kinas, které mají klíčovou roli ve stresové signalizaci) cytoprotektivní mechanismy v nervových tkáních (Nam *et al.*, 2012).

Lokální integumentární poškození blíže neznámým způsobem aktivují serinovou proteasu Hayan v hemolymfě, která převádí profenoloxidasu (PPO) na fenoloxidasu (PO), což je aktivovaná forma enzymu zajišťující tvorbu melaninu. Melanin je biopolymer ukládaný v některých částech těla hmyzu mj. během hojení zranění či izolace patogenů (Sugumaran, 2002). Tato kaskáda je nutná pro aktivaci c-Jun N-terminální kinasy, resp. cytoprotektivního mechanismu v nervových tkáních

významného pro ochranu organismu proti fyzickému traumatu. Obr. 2 zobrazuje podrobněji popsání děje spolu s přesnou lokalizací vznikajících ROS.



Obrázek 2: Model redox-dependentní systémové reakce na poranění. Aktivace serinové proteasy Hayan v hemolymfě v reakci na poranění aktivuje fenoloxidasu (PO) za účelem tvorby melaninu. Aktivace PO Hayan proteasou vede k produkci ROS, které posléze systematicky difundují skrze tělesnou dutinu a slouží jako signály přežití aktivací JNK-dependentního cytoprotektivního mechanismu v nervových buňkách za účelem ochrany organismu vůči fyzickému traumatu. Jafracl je označení pro antioxidační enzym thioredoxinperoxidasu 1 (Upraveno podle Nam *et al.*, 2012).

2.3.3 Transkripční faktor CIF

Je známo, že mnoho druhů hmyzu odpovídá na infekci produkcí humorálních imunitních proteinů v tukových buňkách, tyto proteiny se pak účastní eliminace vnikajících mikroorganismů (Dunn, 1990; Boman *et al.*, 1991). Většina genů kódujících tyto imunitní proteiny jsou většinou rychle indukovány na transkripční úrovni vlivem bakteriální infekce a v menším měřítku i vlivem poranění (Gudmundsson *et al.*, 1991; Sun *et al.*, 1991a; Sun *et al.*, 1991b; Lindström-Dinnetz *et al.*, 1995). Všechny tyto geny obsahují sekvenci homologní k vazebným místům transkripčního faktoru NF- κ B popsaného výše (Baeuerle a Henkel, 1994). U martináče cercopijského (*Hyalophora cecropia*) se na tyto sekvence specificky váže jaderným proteinem *Cecropia* imunoresponsivní faktor (CIF), v případě octomilky obdobně *Drosophila* imunoresponsivní faktor (DIF). Aktivita CIF není detekovatelná u normálního hmyzu, ale je vysoce indukována bakteriemi a všemi dalšími aktivátory imunitních genů. Předpokládá se tedy, že CIF je zásadním transkripčním faktorem pro expresi imunitních genů (Sun a Faye, 1992). Mezi klíčové výsledky vedoucí k pochopení signální úlohy ROS u hmyzu patří zjištění, že *in vitro* podávání H₂O₂ a bakterií mohou aktivovat CIF v buňkách tukového tělíska. Indukce genů imunitních proteinů je tedy zprostředkovaná aktivací CIF podmíněnou oxidací cysteinových thiolů indukovanou oxidačním stresem. V souhrnu lze konstatovat, že vlivem infekce a fagocytózy bakterií hemocyty uvolňují signály, které spouští syntézu imunitních proteinů v buňkách tukového tělíska. ROS jsou významnými kandidáty na roli těchto signálů (Sun a Faye, 1995; Pereira *et al.*, 2001).

2.4 Oxidační stres a antioxidační ochrana u hmyzu

2.4.1 Oxidační stres

Jak již bylo nastíněno v předchozích kapitolách, ROS jsou při fyziologických koncentracích významnou součástí signálních mechanismů regulujících fyziologické pochody organismu, ovšem dojde-li k nerovnováze mezi prooxidanty a antioxidanty, resp. pokud produkce ROS chronicky převyšuje jejich odbourávání, vzniká stav definovaný jako oxidační stres (Felton a Summers, 1995; Sohal a Weindruch, 1996). Tuto rovnováhu mohou narušit stresové faktory jako infekce patogenními viry a bakteriemi, xenobiotika či nevhodná strava. Příliš vysoký obsah bílkovin nebo aminokyselin v potravě může v buňkách vyvolat oxidační stres zvýšením produkce ROS v mitochondriích, oslabením antioxidační obrany či snížením schopnosti opravy oxidovaných molekul (López-Torres a Barja, 2008). Nadměrná produkce ROS narůstající s věkem organismu je základem jedné z teorií stárnutí, která předpokládá, že produkce těchto reaktivních molekul v běžném buněčném aerobním metabolismu může nakonec převýšit antioxidační kapacitu organismu a způsobit nárůst molekulárního poškození biomolekul (tedy oxidace lipidů, proteinů či DNA) a nakonec buněčné, tkáňové či orgánové stárnutí (Williams *et al.*, 2008; Archer *et al.*, 2014). Na posuzování vlivu oxidačního stresu na stárnutí je ideálním modelem právě včela medonosná. Tento létající hmyz vykazuje jednu z nejvyšších mír metabolismu a v jejich letových svalech lze tedy při běžných aktivitách očekávat vysoké úrovně oxidačního stresu (Williams *et al.*, 2008). Včela medonosná je vhodným modelem pro studium stárnutí také díky tomu, že se dlouhodobě, ale i v rámci sezóny vyskytují skupiny včel s různou dobou života. Obzvláště matky žijící až pětisetnásobně déle než trubci a desetkrát déle než dělnice a přežívající několik let reprodukčně aktivního života jsou ideálním modelem pro studium stárnutí (Keller a Jemielity, 2006).

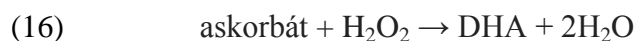
2.4.2 Antioxidační ochrana

Aby se zabránilo výše uvedeným nepříznivým vlivům ROS na daný organismus, musí být aerobní organismy schopny efektivně snižovat hladinu jejich koncentrace (Cadenas, 1989; Archer *et al.*, 2014). V případě hmyzu je to umožněno jednak souborem antioxidačních enzymů, mezi něž řadíme SOD, CAT, APX či GPX a jednak hydrofilní a lipofilní antioxidanty o malé molekulové hmotnosti. Ačkoliv tyto antioxidanty nejsou u hmyzu dobře prostudovány, mohou hrát velmi důležitou roli v antioxidační ochraně. Jedná se například o askorbát (resp. kyselinu askorbovou), glutathion, tokoferoly,

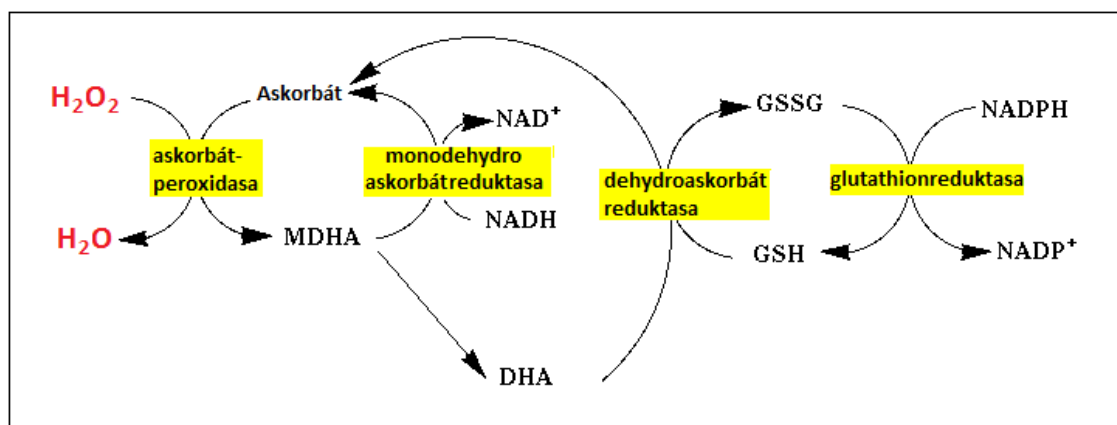
karotenoidy (Felton a Summers, 1995) či protein vitellogenin (Seehuus *et al.*, 2006; Havukainen *et al.*, 2013).

2.4.2.1 Kyselina askorbová a glutathion

Kyselina askorbová je široce rozšířený antioxidant a nezbytná živina pro všechny druhy hmyzu a některé živočichy, protože během evoluce ztratili geny potřebné pro biosyntézu askorbátu a je tedy pro ně nezbytným vitamínem získávaným zejména z rostlinné potravy (Ferne a Tohge, 2015). Kyselina askorbová snižuje hladinu ROS v organismu a to nejúčinněji v přítomnosti tripeptidu glutathionu (Barbehenn *et al.*, 2001) v rámci cyklu tzv. askorbát-glutathionového cyklu (dle objevitelů jeho součástí též nazýván Foyer-Halliwell-Asadův cyklus), v němž dochází k reakci H_2O_2 s askorbátem za tvorby dehydroaskorbátu (DHA, reakce 16 níže), který je zpět převeden na askorbát tokem elektronů z redukovaného glutathionu na DHA (reakce 17 níže).



Zmíněné reakce, v nichž dochází k redukci H_2O_2 na vodu, mohou probíhat i v nepřítomnosti enzymů, nicméně přítomnost APX a dehydroaskorbátreduktasy (DHAR) je velmi urychluje (Barbehenn *et al.*, 2001). Vznikající glutathion disulfid (GSSG) je redukován zpět na glutathion za katalýzy glutathionreduktasou (Obr. 3). Aktivita DHAR byla detekována u mnoha různých druhů larev hmyzu, což naznačuje,



Obrázek 3: Askorbát-glutathionový cyklus. Peroxid vodíku je za katalýzy APX převáděn na vodu za spotřeby askorbátu, z něhož vzniká monodehydroaskorbát (MDHA) a dehydroaskorbát (DHA). MDHA je regenerován za katalýzy monodehydroaskorbátreduktasou, DHA podobně za katalýzy dehydroaskorbátreduktasou za spotřeby glutathionu (GSH), z něhož vzniká glutathion disulfid (GSSG). GSSG je redukován zpět na glutathion za katalýzy glutathionreduktasou. Převzato a upraveno dle Becana *et al.*, (2010).

že APX může být přítomen také u různých druhů hmyzu (Summers a Felton, 1993).

2.4.2.2 Tokoferoly (vitamín E)

Tokoferoly jsou skupina antioxidačních sloučenin (α -, β - a γ -tokoferol) rozpustných v tucích. Jde o deriváty 6-hydroxychromanu s postranním isoprenoidovým řetězcem. Tokoferoly jsou stejně jako β -karoteny známy pro svoji funkci zhášení toxických forem kyslíku nebo pro svoji schopnost bránit peroxidaci lipidů (Halliwell a Gutteridge, 1985). Tokoferoly chrání lipidy tím, že vychytávají peroxylové radikály, které tak nemohou reagovat v dalších krocích řetězových peroxidačních reakcí (Di Mascio *et al.*, 1991).

2.4.2.3 Karotenoidy

Karotenoidy jsou oligomery isoprenu složené z osmi isoprenových zbytků o pěti uhlících (Armstrong a Hearst, 1996). Karotenoidy podobně jako tokoferoly reagují s ROS a proto působí jako antioxidanty (Di Mascio *et al.*, 1991). Jsou to lipofilní barviva s lineárními molekulami obsahujícími konjugované dvojně vazby, jež tvoří delokalizovaný systém elektronů. Karotenoidy díky tomu mohou absorbovat energii excitovaných molekul zvýšenou mírou vibrací (Young a Lowe, 2001) nebo atakem radikálů za současné destrukce molekuly karotenoidu a stabilizace radikálu. Pro stabilizaci radikálu je však důležitá kooperace s dalšími antioxidanty (vitamin E, askorbát) a antioxidačními enzymy, protože dochází ke vzniku štěpných produktů a radikálů a je potřeba postupně zcela utlumit vysokoenergetické stavy volných radikálů (Böhm *et al.*, 1997).

2.4.2.4 Vitellogenin

Vitellogenin je vysokomolekulární glykolipofosfoprotein, jako homodimer o hmotnosti přibližně 250 až 600 kDa obvykle koluje v krvi či hemolymfě. Geny kódující vitellogenin se nachází v řadě různých organismů, mezi něž řadíme hmyz, ryby a žáby (Tufail a Takeda, 2008). U hmyzu je vitellogeneze regulována juvenilním hormonem (Robinson a Vargo, 1997). V případě včely medonosné má vitellogenin hmotnost 180 kDa, je syntetizován v tukovém tělisku a uvolňován do hemolymfy (Fleig, 1995). Bylo zjištěno, že vitellogenin chrání včely před ROS produkovanými vlivem působení herbicidu, protože byl přednostně cílem oxidativní karboxylace ve srovnání s jinými hlavními hemolymfovými proteiny dospělých včel (apolipoprotein 1 a hexamerin). Mimo to utlumení exprese genů vitellogeninu způsobilo významně nižší přežití včel po aplikaci herbicidu, což ukazuje na spojitost vitellogeninu s rezistencí vůči oxidačnímu stresu (Seehuus *et al.*, 2006).

2.5 Přehled publikovaných metod stanovení aktivit hmyzích antioxidačních enzymů

2.5.1 Superoxiddismutasa

Superoxidismutasa patří mezi nejdůležitější části antioxidačních enzymových systémů. Úlohou těchto enzymů je katalýza dismutace superoxidu na méně reaktivní a dále rozložitelnou sloučeninu H_2O_2 a kyslík (Matoušková *et al.*, 2014).

Metody stanovení aktivity tohoto enzymu jsou založeny na schopnosti inhibovat reakce superoxidu s vhodnými činidly, jedná se tedy o nepřímé metody (Paoletti *et al.*, 1986). Známé metody zahrnují jednak produkci superoxidu, např. oxidací xantinu katalyzované xantinoxidasou či reakce NADH s kyslíkem za přítomnosti s fenazinmethosulfátem a v detekci superoxidu vhodnými chromogenními substráty, jako jsou nitrotetrazoliová modř (NBT), cytochrom c nebo pyrogallol, u nichž dochází po reakci se superoxidem k spektrofotometricky měřitelným změnám absorbance (Matoušková *et al.*, 2014). Aktivita SOD v analyzovaném vzorku, katalyzující dismutaci superoxidu, vede ke snížení koncentrace superoxidu a tím ke snížení rychlosti reakcí mezi superoxidy a chromogenní substráty. Tyto metody používají stabilní a nepříliš nákladné chemikálie a umožňuje rychlé a citlivé měření aktivity SOD v čistých a surových enzymových preparátech se zanedbatelným rušením vlivem přítomnosti dalších buněčných složek. Jednotka aktivity SOD je pak definována jako množství enzymu způsobující 50% inhibici oxidace použitého substrátu superoxidem (Paoletti *et al.*, 1986). Ačkoliv Paoletti *et al.* (1986) pracovali se vzorkem krysích jater, tato metoda byla aplikována i na vzorky včely medonosné, resp. na hemolymfu, spermatéku, hrudní svaly, trávicí ústrojí dělnic a oplozených i neoplozených matek a na sperma trubců. Aktivita SOD byla pozorována ve všech zmíněných vzorcích a nejvyšší byla pozorována u hrudních svalů oplozených královen a v hemolymfě dělnic a oplozených i neoplozených matek (Weirich *et al.*, 2002).

Kromě spektrofotometrické metody lze pro detekci aktivity SOD, resp. izoenzymového zastoupení, použít také diskontinuální elektroforézu v polyakrylamidovém gelu za nativních podmínek s následným negativním barvením gelů podle Beauchampa a Fridoviche (1971). V prvním kroku tohoto barvení je gel inkubován ve tmě v roztoku s NBT, následuje inkubace gelu ve tmě v roztoku s riboflavinem, který při vystavení světlu a v přítomnosti kyslíku generuje superoxidový

radikál, roztok dále obsahuje antikoagulant EDTA a stabilizátor volných radikálů tetramethylethyldiamin (TEMED). NBT je redukován vznikajícím superoxidovým radikálem na tmavě modrý formazán. Místa výskytu SOD, kde byla enzymaticky snížena koncentrace superoxidového radikálu, lze pak pozorovat pomocí světlých proužků na tmavém pozadí gelu (Chen a Pan, 1996).

2.5.2 Askorbátperoxidasa

Dalším významným antioxidačním enzymem je již zmiňovaná APX katalyzující redukci H_2O_2 s využitím askorbátu jako substrátu a donoru elektronů a to u savců, rostlin, ale i u hmyzu (Mathews *et al.*, 1997).

Spektrofotometrická metoda detekce aktivity APX je založena na měření poklesu absorbance vlivem oxidace askorbátu na dehydroaskorbát H_2O_2 (Kelly a Latzko, 1979; Shigeoka *et al.*, 1980). Hodnota absorpčního maxima askorbátu je 265 nm, kvůli vysokým hodnotám absorbance je však měření prováděno při 290 nm (Nakano a Asada, 1981). Aktivita enzymu je vyjádřena jako množství askorbátu oxidovaného za min. s použitím extinkčního koeficientu $2,8 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Asada, 1984). Zmíněná metoda byla aplikována kromě rostlin později i na několik druhů hmyzu (Mathews *et al.*, 1997; Barbehenn, 2002; Krishnan a Kodrík, 2006) včetně včel (Korayem *et al.*, 2012).

Metoda detekce aktivity APX pomocí diskontinuální elektroforézy v polyakrylamidovém gelu za nativních podmínek s následným negativním barvením gelů je založena na schopnosti tohoto enzymu zabránit redukci NBT v přítomnosti H_2O_2 díky rychlé oxidaci askorbátu. Gely jsou inkubovány postupně v roztoku pufru s askorbátem, dále v roztoku pufru s askorbátem a H_2O_2 , a po oplachu v pufru dále v barvicím roztoku pufru s NBT a TEMED. Bylo zjištěno, že metoda je citlivá a specifická pro aktivitu APX, kterou pozorujeme jako achromatický pás na purpurově modrém pozadí (Mittler a Zilinskas, 1993).

2.5.3 Katalasa

Neméně důležitým antioxidačním enzymem je CAT zajišťující rozklad dvou molekul H_2O_2 za vzniku vody a kyslíku (Matés *et al.*, 1999). Spektrofotometrická metoda stanovení aktivity CAT podle Aebi (1984) vychází z rozkladu H_2O_2 , resp. z poklesu absorbance při 240 nm, kdy rozdíl v absorbanci za jednotku času je měřítkem aktivity CAT, která je definována jako mikromolární množství H_2O_2 redukováného za min. na miligram proteinů za použití extinkčního koeficientu $39,4 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Koncentrace

H₂O₂ by měla být relativně nízká (10 mmol·l⁻¹), aby se předešlo inaktivaci enzymu během testu a tvorbě bublin v důsledku uvolnění kyslíku. Měření se provádí při pH 7 (Aebi, 1984) a i v tomto případě byla metoda aplikována na hmyzí vzorky vč. včelích - Nikolić *et al.* (2015) metodu použili na homogenáty celých těl včely, stejně jako Chakrabarti *et al.* (2015).

Detekce aktivity CAT pomocí diskontinuální elektroforézy v polyakrylamidovém gelu za nativních podmínek využívá při negativním barvení podle Clare *et al.* (1984) křenovou peroxidasu a její substrát H₂O₂ společně s chromogenem diaminobenzidinem (DAB). Peroxidasu katalyzuje H₂O₂-dependentní peroxidaci diaminobezidinu na barevný produkt. V místech, kde je H₂O₂ rozložen působením CAT, dojde k vytvoření achromatických bandů na hnědém pozadí.

3 Experimentální část

3.1 Materiál

3.1.1 Biologický materiál

V rámci experimentální části této bakalářské práce bylo pracováno se vzorky včely medonosné (*Apis mellifera*) poskytnutými Mgr. Jiřím Danihlíkem, Ph.D. a odebranými v průběhu roku 2017 ze včelnice v okolí Valašského Meziříčí bez ohledu na stáří jednotlivých včel. Odebrané vzorky byly zamrazeny a uchovávány při -80 °C.

3.1.2 Chemikálie

Akrylamid (Sigma-Aldrich, USA)

Bisakrylamid (MP Biomedicals, USA)

Bromfenolová modř (Sigma-Aldrich, Rakousko)

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

Diaminobenzidin (Sigma-Aldrich, Německo)

Diethylentriaminpentaacetát (Sigma-Aldrich, Nizozemí)

Dihydrát hydrogenfosforečnanu sodného (Sigma-Aldrich, Německo)

Dihydrogenfosforečnan draselný (Penta, Česká republika)

D-Mannitol (Duchefa Biochemie, Nizozemí)

Glycerol (Lach-Ner, Česká republika)

Glycin (Sigma-Aldrich, Čína)

Hovězí sérový albumin (Sigma-Aldrich, Německo)

Hydrogenfosforečnan draselný (Lach-ner, Česká republika)

Katalasa z hovězích jater (Serva, Německo)

Křenová peroxidasa (Serva, Německo)

Kyselina askorbová (Sigma-Aldrich, Čína)

Kyselina fosforečná 85% (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)

Kyselina chlorovodíková (Lach-Ner, Česká republika)

Kyselina octová 80% (Lach-Ner, Česká republika)

Metanol (Lach-Ner, Česká republika)

Monohydrát dihydrogenfosforečnanu sodného (Spolek pro chemickou a hutní výrobu, Československo)

NBT (Carl Roth GmbH + Co. KG, Německo)

n-Butanol (Sigma-Aldrich, Německo)

Peroxid vodíku 30% (Penta, Česká republika)

Persíran amonný (Sigma-Aldrich, Japonsko)
Pyrogallol (Sigma-Aldrich, Velká Británie)
Riboflavin (Sigma-Aldrich, Čína)
Síran amonný (Penta, Česká republika)
Sodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové (Sigma-Aldrich, Německo)
Superoxiddismutasa z hovězích erythrocytů (Serva, Německo)
TEMED (Sigma-Aldrich, Čína)
Tris (Sigma-Aldrich, Německo)

3.1.3 Přístrojové vybavení

Analytické váhy (Sartorius, Německo)
Automatické pipety (Eppendorf, Německo)
Digitální pH metr InoLab pH level 1 (InoLab, Německo)
Digitální předvážky (Radwag®, ČR)
Elektroforetický systém Mini PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad, USA)
Elektromagnetická míchačka MS-3000 (Biosan, Litva)
Gel Doc EZ System (Bio-Rad, USA)
Chlazená centrifuga 5415 R (Eppendorf, Německo)
Mikrodestičkový spektrofotometr Reader Synergy HT (BioTek Instruments, USA)
Ultrazvuková lázeň (Kraintek, ČR)
Vortex V1-Plus (Biosan, Litva)
Zdroj 300V OmniPAC MAXI (Bio-Rad, USA)

3.2 Metody

3.2.1 Spektrofotometrické stanovení koncentrace proteinů

Koncentrace proteinů ve vzorcích byla stanovována metodou podle Bradforda (1976) založené na vazbě barviva Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB G-250) na protein. V rámci stanovení kalibrace pro výpočet koncentrace proteinů bylo do jamky mikrodestičky postupně pipetováno 45 μl deionizované H_2O , 5 μl standardu (hovězí sérový albumin, BSA, o koncentraci 0,2 – 1,4 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), resp. vzorku proteinu a nakonec 200 μl pracovního roztoku činidla Bradfordové. Tento roztok byl připraven vždy čerstvý před vlastním měřením naředěním zásobního roztoku CBB G-250 deionizovanou H_2O v poměru 1:4 (v:v). Příprava zásobního roztoku spočívala v rozpuštění 50 mg CBB G-250 v 25 ml MeOH a 50 ml 85 % kyseliny fosforečné a doplnění na objem 100 ml deionizovanou H_2O . Po napipetování reakčních komponent do jamek mikrodestičky následovalo jemné protřepání a vyvíjení zbarvení po dobu 5 min. Nakonec bylo provedeno spektrofotometrické měření při vlnové délce 595 nm.

3.2.2 Příprava vzorků pro spektrofotometrické stanovení aktivity superoxididismutasy

Před samotným zpracováním byly vzorky včel skladovány v mrazáku při -80°C , při manipulaci a oddělování hlav, hrudníků a zadečků byly včelí vzorky chlazeny na ledové lázni v mikrozkrumavkách. Vybraná část včelího vzorku byla homogenizována na vychlazené třecí misce ve vychlazeném extrakčním pufru (K^+ -fosfátový pufr 50 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ pH 7,5 s diethylentriaminpentaacetátem, DTPA, o koncentraci 1 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) v poměru 1:4 (w:v). Získaný extrakt byl centrifugován při 4°C , 16 000x g po dobu 10 min., následně byl odebrán supernatant, centrifugace zopakována při stejných podmínkách a nově získaný supernatant byl dále uchováván na ledové lázni a případně naředěn (viz výsledková část).

Při testování vlivu teplotního stresu na aktivitu SOD bylo pracováno se dvěma skupinami živých včel – jedna z nich sloužila jako vzorek podrobený teplotnímu stresu a druhá byla ponechána jako kontrolní vzorek při laboratorní teplotě. Stresované včely byly ponechány 2 hodiny v termostatu vyhřátém na teplotu 45°C . Poté byly včely uspány dusíkem, rozpreparovány na jednotlivé tělní části a ty byly před dalším zpracováním zamraženy a skladovány při teplotě -30°C .

3.2.3 Spektrofotometrické stanovení aktivity superoxidodismutasy

Principem spektrofotometrického stanovení aktivity SOD podle Marklunda a Marklundové (1974) je měření změny absorbance při 420 nm v triplicátech po dobu 5 min. při 25 °C odpovídající autooxidaci pyrogallolu. Jednotka aktivity SOD je definována jako množství enzymu katalyzující 50% inhibici rychlosti oxidace pyrogallolu (Marklund a Marklundová, 1974). Specifická aktivita SOD pak byla vypočítána z aktivity enzymu a obsahu proteinů v daném vzorku.

Vlastnímu měření aktivity SOD ve vzorcích včel předcházela optimalizace metody na komerčním preparátu SOD z hovězích erythrocytů od spol. Serva (kat. číslo 35700, EC 1.15.1.1). Měření probíhalo na 96jamkových destičkách a do každé jamky triplicátu bylo pipetováno 20 μ l (není-li uvedeno jinak) roztoku enzymu (navážka 1 mg SOD na 1 ml K-fosfátového pufru o koncentraci 50 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ s DTPA o koncentraci 1 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, pH=7,5), 220 μ l pufru a 10 μ l pyrogallolu o koncentraci 6 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ v HCl o koncentraci 10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Při měření aktivity SOD ve vzorcích včel bylo do jamky pipetováno namísto roztoku komerčního enzymu příslušné množství extraktu z jednotlivých tělních částí včel.

3.2.4 Příprava vzorků pro spektrofotometrické stanovení aktivity askorbátperoxidasy

Před zpracováním byly vzorky včel skladovány v mrazáku při -80°C a při manipulaci byly vzorky chlazeny na ledové lázni v mikrozkušnicích. Vybraná část včelího vzorku pak byla homogenizována na vychlazené třecí misce ve vychlazeném extrakčním pufru v poměru 1:2 (w:v) s přidaným askorbátem (K⁺-fosfátový pufr o koncentraci 100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a pH=6,0, 10% mannitol a kys. askorbová o koncentraci 2 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$). Získaný extrakt byl centrifugován při 4 °C, 16 000x g po dobu 10 min., následně byl odebrán supernatant, centrifugace zopakována při stejných podmínkách a nově získaný supernatant byl dále uchováván na ledové lázni a případně naředěn (viz výsledková část).

3.2.5 Spektrofotometrické stanovení aktivity askorbátperoxidasy

Měření aktivity APX bylo provedeno podle Mathews *et al.* (1997) s úpravami (pH 6,0 a namísto sorbitolu byl pro stabilizaci APX použit mannitol) a spočívalo ve spektrofotometrickém sledování poklesu absorbance při 290 nm vlivem oxidace askorbátu na dehydroaskorbát H₂O₂ (Kelly a Latzko, 1979; Shigeoka *et al.*, 1980) za použití mikrodestičky UV Star při 25 °C po dobu 10 min.

Do jamek mikrodestičky byla napipetována různá množství neředěného extraktu z hlav, hrudníků a zadečků, 10 µl pracovního roztoku askorbátu, K⁺-fosfátový pufr o koncentraci 100 mmol·l⁻¹ v objemu nutném pro doplnění celkového objemu reakce 250 µl a reakce byla zahájena přidavkem 20 µl roztoku H₂O₂ o koncentraci 6,0 mmol·l⁻¹.

3.2.6 Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za nativních podmínek – příprava gelu a elektrodového pufru

V prvním kroku byl připraven 10% dělicí gel postupným pipetováním jednotlivých složek podle tabulky 1 do kádinky a po zahájení polymerace gelu přidavkem roztoku persíranu amonného (APS) byl přenesen Pasteurovou pipetou do prostoru mezi skla. Na již tuhý zpolymerovaný dělicí gel byl následně nanesen zaostřovací gel připravený obdobně jako dělicí gel pipetováním složek podle tabulky 1.

Do jamek připraveného polyakrylamidového gelu bylo před spuštěním elektroforézy pipetováno dané množství směsi glycerolu se vzorkem v poměru 1:3 (v:v) a do krajních jamek byly napipetovány 3 µl směsi glycerolu a bromfenolové modři taktéž v poměru 1:3 (v:v).

Elektrodový pufr (pH 8,3) byl připraven rozpuštěním 6,05 g Tris a 28,82 g glycinu v 1 l destilované vody a následným doplněním do objemu 2 l. Do dalšího použití byl uchováván při 4 °C. Elektroforéza byla spuštěna nejdříve při konstantním napětí 100 V a po doputování zóny bromfenolové modři na rozhraní zaostřovacího a dělicího gelu bylo konstantní napětí zvýšeno na 180 V.

Tab. 1: Složení dělicího a zaostřovacího gelu (objemy uvedeny v ml, AA - akrylamid, BIS - N,N'-metylen-bisakrylamid)

Typ gelu	AA/BIS 30%/0,8%	Tris HCl 1,5M, pH 8,8	Tris HCl 0,5M, pH 6,8	dH ₂ O	TEMED	APS
10% dělicí	6,6	5	-	8,1	0,01	0,2
5% zaostřovací		-	1,25	6,9	0,01	0,1

3.2.7 Detekce proteinů v polyakrylamidovém gelu koloidním CBB G-250

Po ukončení elektroforézy a vyjmutí gelů z elektroforetické aparatury byly gely 20 min. inkubovány ve fixačním roztoku o tomto složení: 45% methanol, 1% kyselina octová, destilovaná voda. Následně byl gel inkubován přes noc v barvicím roztoku o složení: 17% síran amonný, 3,5% kyselina fosforečná, 2% roztok Coomassie Blue G-250, 34% methanol a destilovaná voda. Dále byl gel promýván odbarvovacím roztokem (10% methanol a 2% kyselina octová)(Neuhoff *et al.*, 1985). Modré bandy odpovídající detekovaným proteinům byly následně zdokumentovány dokumentačním zařízením Gel Doc EZ Imager.

3.2.8 Detekce aktivity superoxidodismutasy v polyakrylamidovém gelu

V prvním kroku byl připraven polyakrylamidový gel podle postupu uvedeného v bodě 3.2.2. Po proběhlé diskontinuální elektroforéze za nativních podmínek byly gely vyjmuty z elektroforetické komůrky a barveny při pokojové teplotě podle Beauchampa a Fridoviche (1971). Byly připraveny 2 roztoky pro barvení vždy v objemu 60 ml. Roztok A se skládal z K^+ -fosfátového pufru o koncentraci $2,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a pH 7,8 s NBT o koncentraci $2,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Roztok B se skládal z K^+ -fosfátového pufru stejného složení jako v roztoku A s rozpuštěným riboflavinem o koncentraci $0,06 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, EDTA o koncentraci $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $195 \mu\text{l}$ TEMED. Riboflavin a TEMED byl přidán jako poslední přísada roztoku. Gely byly inkubovány ve tmě v roztoku A po dobu 20 min. Po uplynutí této doby byly přesunuty na 15min. inkubaci do roztoku B, taktéž ve tmě. Po inkubaci byly osvětleny studeným světlem až do objevení světlých proužků na tmavém pozadí. Výsledky byly následně zdokumentovány dokumentačním zařízením Gel Doc EZ Imager.

3.2.9 Detekce aktivity katalasy v polyakrylamidovém gelu

V první řadě došlo opět k přípravě polyakrylamidového gelu podle postupu v bodě 3.2.2. Po proběhlé diskontinuální elektroforéze za nativních podmínek byly gely vyjmuty z elektroforetické komůrky a inkubovány při pokojové teplotě nejdříve 45 min. ve 20 ml K^+ -fosfátového pufru o koncentraci $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a pH=7,0 obsahující 1 mg křenové peroxidasy. Po uplynutí stanovené doby následovalo odlití pufru a 10min. inkubace ve 20 ml roztoku H_2O_2 v pufru o koncentraci $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Následoval oplach gelu v destilované vodě a vložení gelu do 20 ml barvicího roztoku (10 mg DAB v pufru) s následným sledováním vývoje tmavohnědého pozadí s CAT jako bílými

proužky. Výsledky byly následně zdokumentovány dokumentačním zařízením Gel Doc EZ Imager.

3.2.10 Detekce aktivity askorbátperoxidasy v polyakrylamidovém gelu

Nejdříve byl připraven polyakrylamidový gel podle postupu v bodě 3.2.2. Po proběhlé diskontinuální elektroforéze za nativních podmínek byly gely vyjmuty z elektroforetické komůrky a barveny při pokojové teplotě podle Mittler a Zilinskas, (1993). Gely byly nejdříve inkubovány 30 min. v 50 ml K^+ -fosfátového pufru o koncentraci $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $\text{pH}=7,0$ obsahující kyselinu askorbovou o koncentraci $4 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (výměna roztoku každých 10 min.). Následovala inkubace v pufru s kyselinou askorbovou o koncentraci $4 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a H_2O_2 o koncentraci $2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Dále byly gely 5x oplachovány v pufru po dobu 20 vteřin a inkubovány v barvicím roztoku (pufr, TEMED o koncentraci $28 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, NBT o koncentraci $2,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$). V rámci detekce izoenzymů byly pozorovány achromatické pásy na purpurově modrém pozadí, což bylo zdokumentováno dokumentačním zařízením Gel Doc EZ Imager.

3.2.11 Zpracování dat

Data vzešlá z výše popisovaných experimentů byla zpracována pomocí programů Microsoft Excel 2013 pro základní kalkulace, výpočet směrodatné odchylky a sestavení grafů ze získaných dat, a Statistica 12, v němž bylo nejdříve testováno normální rozdělení hodnot a poté prováděny t-testy na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

4 Výsledky a diskuze

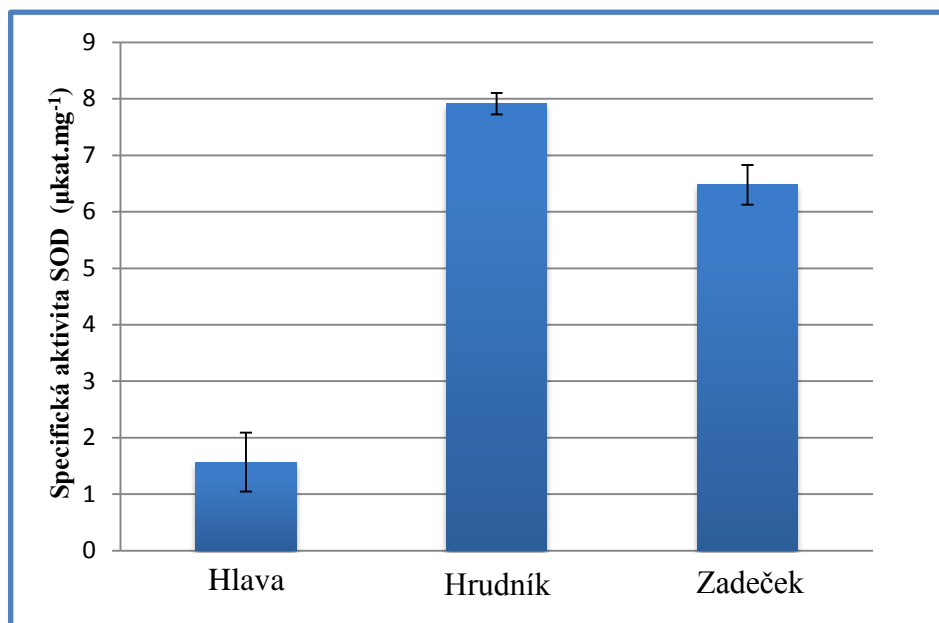
4.1.1 Spektrofotometrické stanovení aktivity komerční superoxiddismutasy

V rámci zavedení této metody bylo nejdříve pracováno s komerční SOD z hovězích erythrocytů. Měření bylo prováděno postupně s 10x, 100x a 1000x naředěným roztokem enzymu, při čemž jako nejoptimálnější se jevílo ředění 100x. Při desetinásobném ředění a různém objemu roztoku enzymu (v rozmezí 5-15 μl) v reakční směsi nebyl zaznamenáván žádný nebo velmi malý nárůst absorbance (změna absorbance v řádu setin, maximálně desetin jednotek), což svědčí o žádné nebo minimální oxidaci pyrogallolu, resp. tato oxidace byla následkem příliš vysoké aktivity SOD z 98 – 99 % inhibována. Naproti tomu měření při tisícinásobném zředění vykazovalo vysoké hodnoty nárůstu absorbance v důsledku oxidace pyrogallolu a tato reakce byla inhibována při 5-15 μl roztoku enzymu v reakční směsi z 8,2 - 15,8 %. Inhibice pyrogallolu při stonásobném ředění vykazovala s rostoucím množstvím pipetovaného roztoku enzymu (opět 5-15 μl) odpovídající růst a dosahovala od 43,4 % do 87,6 %. Toto ředění se tedy jevílo jako nejoptimálnější a bylo použito pro další měření a výpočty specifické aktivity, která u komerční SOD dosahovala řádově stovky $\mu\text{kat}\cdot\text{mg}^{-1}$ v závislosti na ředění.

V rámci optimalizace popisované metody byl také sledován vliv purifikace vzorků SOD gelovou chromatografií na kolonkách Illustra NAPTM 5 Columns (GE Healthcare). Na kolonky bylo nanášeno 100 μl neředěného roztoku SOD a po vsáknutí následovalo nanášení 400 μl pufru, při čemž bylo zachyceno 500 μl eluátu z kolonky. Jelikož eluce prvních 500 μl nevykazovala žádnou enzymovou aktivitu, bylo potřeba aplikovat dalších 500 μl pufru na kolonku a znovu odebrat další frakce o objemu 500 μl z kolonky – po počáteční eluci 500 μl bylo takto zachyceno dalších 2x 500 μl eluátu. V pořadí první eluát vykazoval enzymovou aktivitu pohybující se v řádech desetín $\mu\text{kat}\cdot\text{mg}^{-1}$, druhý a třetí eluát již v řádech jednotek $\mu\text{kat}\cdot\text{mg}^{-1}$. Z toho lze vyvodit závěr, že měření s prvním eluátem, jak by vyplývalo z návodu výrobce kolonek, je nedostačující z důvodu pomalejší eluce enzymu z kolonek.

4.1.2 Spektrofotometrické stanovení aktivity superoxiddismutasy ve vzorcích včel

Po zavedení a optimalizaci spektrofotometrického stanovení aktivity SOD s pomocí komerčního enzymu byla metoda aplikována i na včelí extrakty. Postupně bylo pracováno s extrakty z hlav, hrudníků a zadečků. Z výsledků měření, že nejvyšší

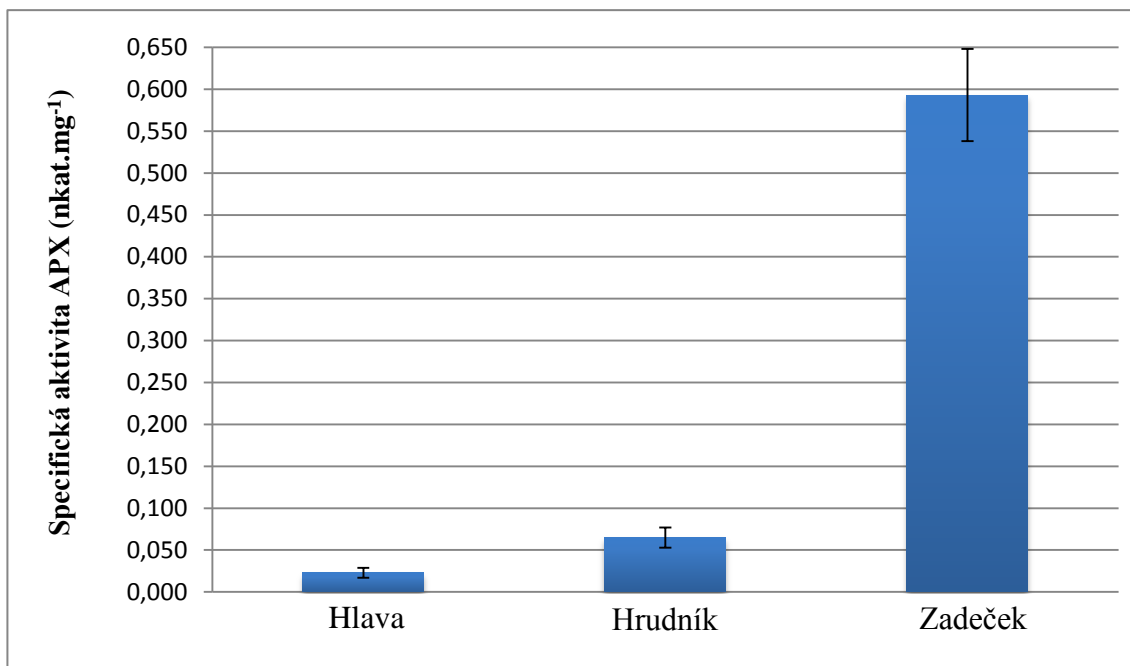


Obrázek 4: Aktivita SOD v extraktech z tělních částí včel. Chybové úsečky v příslušných sloupcích grafu odpovídají směrodatné odchylce průměrů hodnot.

aktivita SOD byla naměřena v extraktech z hrudníků, což je v souladu s již dříve zmíněným faktem, že právě v této tělní části se nachází letací svalstvo s vysokými metabolickými nároky a vysokou produkcí ROS (obr. 4). Intenzivní svalová námaha spojená s letem včely může až stonásobně zrychlit metabolismus (Suarez *et al.*, 1999), jehož nedílnou součástí je mj. mitochondriální dýchací řetězec a takovéto zvýšení metabolických nároků s sebou nese i zvýšenou produkci ROS tokem elektronů na molekulární kyslík odbočením z dýchacího řetězce (Fridovich, 2004). Druhá nejvyšší aktivita byla naměřena v extraktech ze zadečků a nejnižší aktivita v extraktech z hlav. Vzhledem k tomu, že v zadečku včely se nachází hlavní část trávicího ústrojí, a že potrava býložravého hmyzu může být bohatá na prooxidanty zvyšující oxidační stres (Ahmad, 1992), lze zvýšenou aktivitu SOD v extraktu ze včelích zadečků přisoudit právě obraně proti prooxidantům v přijímané potravě. Weirich *et al.* (2002) zaznamenali vysokou aktivitu SOD v hemolymfě. Vzhledem k tomu, že včela medonosná má otevřenou cévní soustavu a hemolymfa se rozlévá volně mezi orgány všech tří tělních částí, diskutovaná data mohou být tímto částečně zkreslena.

4.1.3 Spektrofotometrické stanovení aktivity askorbátperoxidasy ve vzorcích včel

Při tomto stanovení nebyl k dispozici komerční preparát enzymu, v rámci zavedení metody bylo tedy pracováno přímo s extrakty z jednotlivých tělních částí včel (obr. 5). Pro získání lineárního poklesu absorbance bylo nejvhodnější vzorek neředit a namísto



Obrázek 5: Aktivita APX ve vzorcích včel. Chybové úsečky v příslušných sloupcích grafu odpovídají směrodatné odchylce průměrů hodnot.

20 μ l extraktu podle Mathews *et al.* (1997) pipetovat do jamky mikrotitrační destičky 50 μ l extraktu z hlav, 30 μ l extraktu z hrudníků a 10 μ l extraktu ze zadečků. Oproti zmíněnému postupu byl také použit pracovní roztok H_2O_2 o koncentraci 6 mmol.l⁻¹. Za účelem snížení možné interference CAT, jejíž pH optimum je 7 (Çetinus a Öztop, 2003), bylo sníženo pH pufru na 6,0, což mělo také pozitivní vliv na časový průběh sledovaného poklesu absorbance.

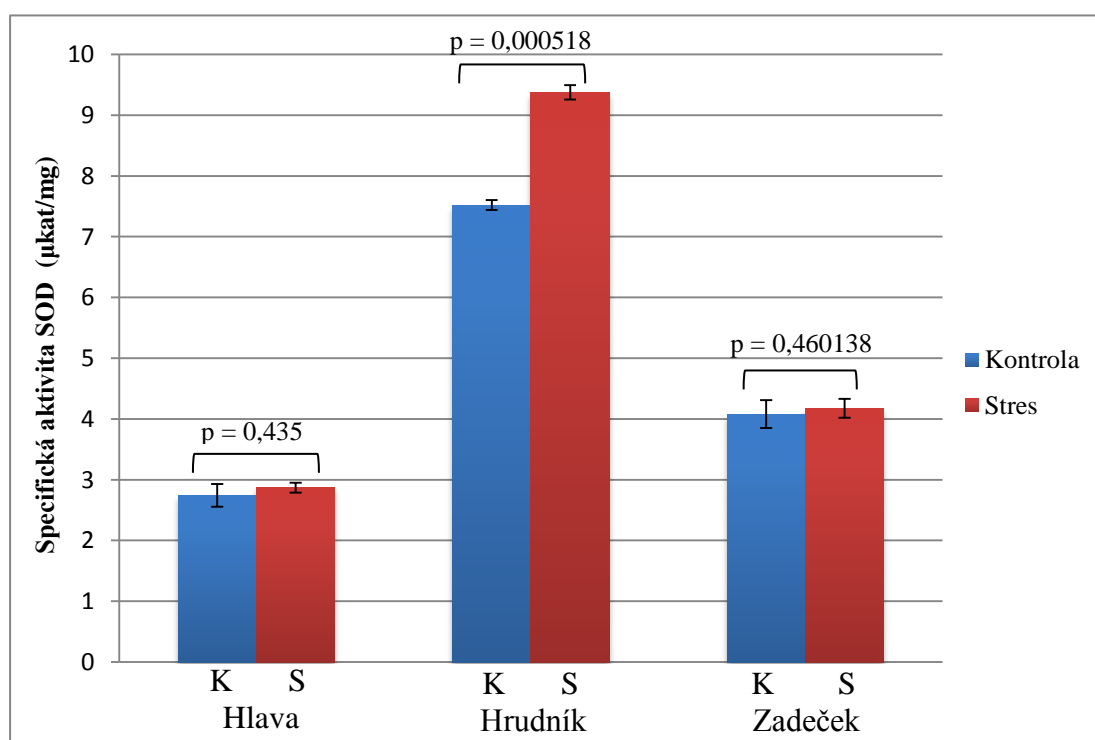
Z výsledků měření vyplývá, že nejvyšší aktivita APX byla stanovena v extraktech ze zadečků (obr. 5). Výrazně nižší aktivita byla stanovena v extraktech z hlav a hrudníků. Mathews *et al.* (1997) zjistili, že u *H. zea* je APX aktivní v Malpighiho trubicích, zároveň objevili relativně vysokou aktivitu v tukovém tělísku a dále ve slinných žlázách a ve střevě, což je spojováno s možnou významnou funkcí APX při odstraňování peroxidů z přijaté stravy nebo těch, které se vytvářejí ve střevě během časného rozkladu potravy. Vzhledem k tomu, že u včely medonosné je převážná část trávicího ústrojí (tukové tělísko, střevo i Malpighiho trubice) lokalizována v zadečku, získané výsledky naznačují možnou úlohu APX právě při antioxidační ochraně proti prooxidantům přijímaným z potravy či vznikajícím v průběhu trávení.

4.1.4 Testování vlivu teplotního stresu včel na aktivitu superoxiddismutasy a askorbátperoxidasy

Během dvouhodinové expozice teplotě 45 °C byly stresované včely v porovnání s kontrolními včelami viditelně aktivnější, což se projevovalo nejen rychlým šplhavým pohybem po stěnách komůrky, ale i intenzivnějšími pohyby křídel. Nedošlo k úhynu žádné ze včel.

4.1.4.1 Spektrofotometrické stanovení aktivity superoxiddismutasy ve vzorcích stresovaných včel

Díky zavedení metody spektrofotometrického stanovení aktivity SOD ve vzorcích včel bylo možné zkoumat vliv teplotního stresu včel na aktivitu tohoto enzymu (obr. 6). U včel, jež podstoupily dvouhodinovou expozici zvýšené teplotě 45 °C, je oproti kontrolní skupině patrná zvýšená aktivita SOD v hrudnících, resp. zde výsledek t-testu prokázal statisticky významný rozdíl mezi oběma skupinami (hodnota p nižší, než 0,05), na rozdíl od ostatních tělních částí, v nichž se porovnávané skupiny statisticky významně nelišily. Zvýšená intenzita pohybu křídel v porovnání s kontrolními včelami může souviset se snahou včel uletět z prostoru průhledné

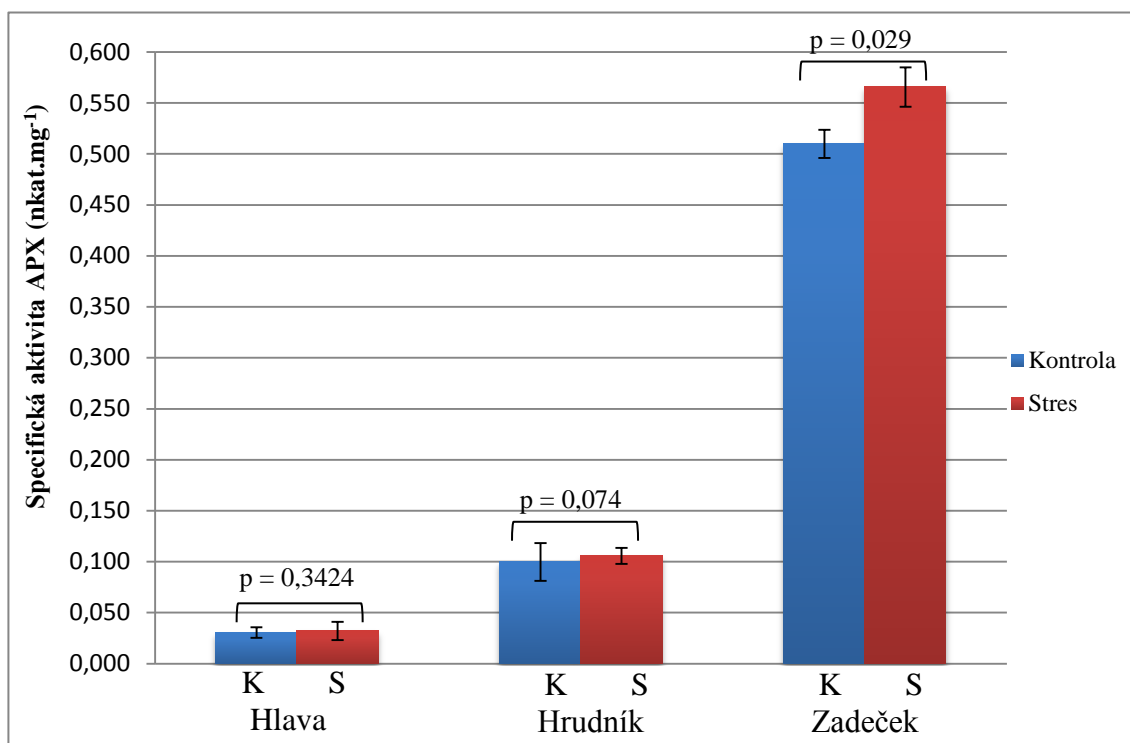


Obrázek 6: Aktivita SOD ve vzorcích kontrolních a teplotně stresovaných včel. Kontrolní vzorek včel - označení písmenem K a modré zbarvení, teplotně stresované včely - označení písmenem S a červené zbarvení. Svorky v grafu značí porovnání aktivity SOD v obou skupinách včel pomocí t-testu. Chybové úsečky v příslušných sloupcích grafu odpovídají směrodatné odchylce průměrů hodnot.

komůrky ven. Může však také souviset se snahou včel ochladit se (Roberts a Harrison, 1998). Williams *et al.* (2008) publikovali práci, v níž dospěli k faktu, že metabolicky náročný let vystavuje létací svaly vysokým hladinám ROS, protože po 6 hodinách chování odpovídajícímu shánění potravy došlo u mladých včel ke zvýšení antioxidační kapacity o 60 % a během letu dosahují hrudníky včel až 40 °C (Roberts a Harrison, 1999). Williams *et al.* (2008) uvádějí, že zvýšení antioxidační kapacity bylo pozorováno u létacích svalů, nikoliv v hlavové tkáni, což naznačuje, že potenciální poškození spojené s letem je lokalizované jen u aerobně aktivních tkání (Banerjee *et al.*, 2003). Vystavení včel teplotnímu stresu spojeného s vyšší aktivitou jejich létacích svalů tedy může umocnit negativní vliv létání na hrudní tkáň spojený s oxidačním stresem.

4.1.4.2 Spektrofotometrické stanovení aktivity askorbátperoxidasy ve vzorcích stresovaných včel

Po zavedení spektrofotometrického stanovení APX ve vzorcích včel byl zkoumán vliv teplotního stresu včel na aktivitu tohoto enzymu. Výsledky měření přibližně korespondují s výsledky měření v kapitole 4.1.3, tedy nejvyšší aktivita APX byla naměřena v extraktech ze zadečků a podstatně nižší v extraktech z hlavy a hrudníků (obr. 7). Co se týče samotného vlivu zvýšené teploty na aktivitu enzymu, z měření



Obrázek 7: Aktivita APX ve vzorcích kontrolních a teplotně stresovaných včel. Kontrolní vzorek včel - označení písmenem K a modré zbarvení, teplotně stresované včely - označení písmenem S a červené zbarvení. Svorky v grafu značí porovnání aktivity SOD v obou skupinách včel pomocí t-testu. Chybové úsečky v příslušných sloupcích grafu odpovídají směrodatné odchylce průměrů hodnot.

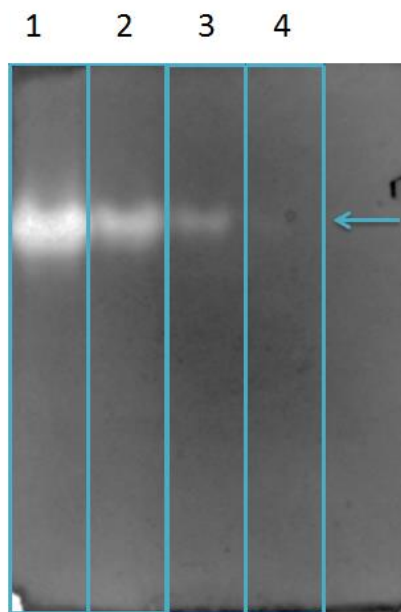
vyplývá, že statisticky významný rozdíl mezi vzorky z kontrolních a stresovaných včel byl pouze u extraktu ze zadečků, kde byl zaznamenán nárůst aktivity APX po vystavení včel zvýšené teplotě. U extraktů z hlav a hrudníků byla aktivita APX ve srovnání s extrakty ze zadečků velmi malá a z výsledků měření dále vyplývá, že mezi vzorky z kontrolních a stresovaných včel není statisticky významný rozdíl.

Lu *et al.* (2014) zkoumali vliv zvýšené teploty na růst, vývoj a aktivitu mj. APX u *Mononychellus mcgregori*, rostlinného hmyzího škůdce. Výzkum prokázal výrazný nárůst aktivity APX při vystavení zmíněného organismu zvýšené teplotě, což je v tomto výzkumu spojováno se závěrem, že takovéto změny v enzymové aktivitě jsou jedním z mechanismů přežití při vysokých teplotách (Sørensen *et al.*, 2001; Du *et al.*, 2007). Nárůst aktivity APX v extraktech ze zadečků tedy naznačuje možnou roli tohoto enzymu v antioxidační ochraně při teplotním stresu. Důležitým faktem při tom je, že se zvyšující teplotou narůstají respirační nároky organismu, což ve své práci uvádí Neven (2000) a dodává, že na tepelný stres reagují hmyzí buňky podobně jako u jiných organismů akumulací tzv. heat shock proteinů (HSP, proteiny teplotního šoku). Jejich zástupce HSP70 funguje jako chaperon, váže se na nesbalené proteiny, zajišťuje tak jejich ochranu či usnadňuje jejich zpětné sbalení po vystavení vysoké teplotě. K této činnosti je potřeba ATP, a protože kyslík je klíčový pro produkci ATP v rámci procesu oxidativní fosforylace, může mít ve zvýšené míře za následek zvýšenou tvorbu ROS, a lze očekávat i vyšší aktivitu antioxidačních enzymů, resp. APX.

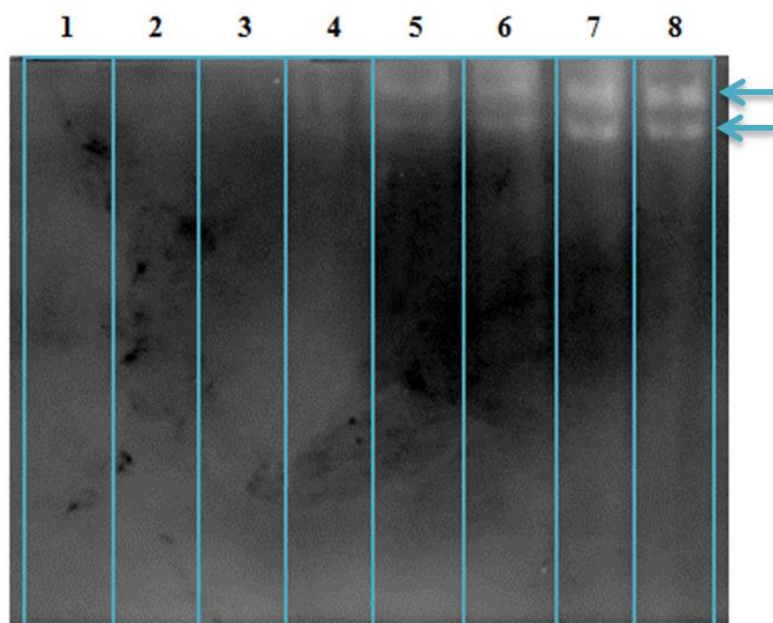
Nutno dodat, že Lu *et al.* (2014) ve své práci zaznamenali vyšší nárůst aktivity u stresovaného organismu v porovnání s kontrolními vzorky ponechanými při laboratorní teplotě. Tento nárůst však vrcholil v první hodině expozice vysoké teplotě, v pozdější fázi následoval již pokles aktivity. Teplotní stres prováděný v rámci této bakalářské práce trval 2 hodiny, což podle výsledků Lu *et al.* (2014) může být již za vrcholem případně zvýšené aktivity APX a tedy rozdíl oproti kontrolní skupině nemusí být tak významný.

4.1.5 Detekce aktivity komerční superoxiddismutasy v polyakrylamidovém gelu

Tato metoda byla úspěšně otestována, z negativního barvení gelu je patrná detekce aktivity jednoho izoenzymu komerční SOD, při čemž nejvýraznější aktivita byla detekována u neředěného roztoku enzymu a s rostoucím ředěním velikost a intenzita světlého pásu klesá (obr. 8). Při tisícinásobném ředění preparátu SOD je světlý pás již těžko pozorovatelný.



Obrázek 8: Detekce komerční SOD v polyakrylamidovém gelu za nativních podmínek pomocí negativního barvení s NBT. Sloupce označené číslicemi znázorňují zóny s příslušnými vzorky SOD: 1 – bez ředění, 2 – ředění 10x, 3 – ředění 100x, 4 – ředění 1000x. Modrá šipka ukazuje polohu bandů SOD.



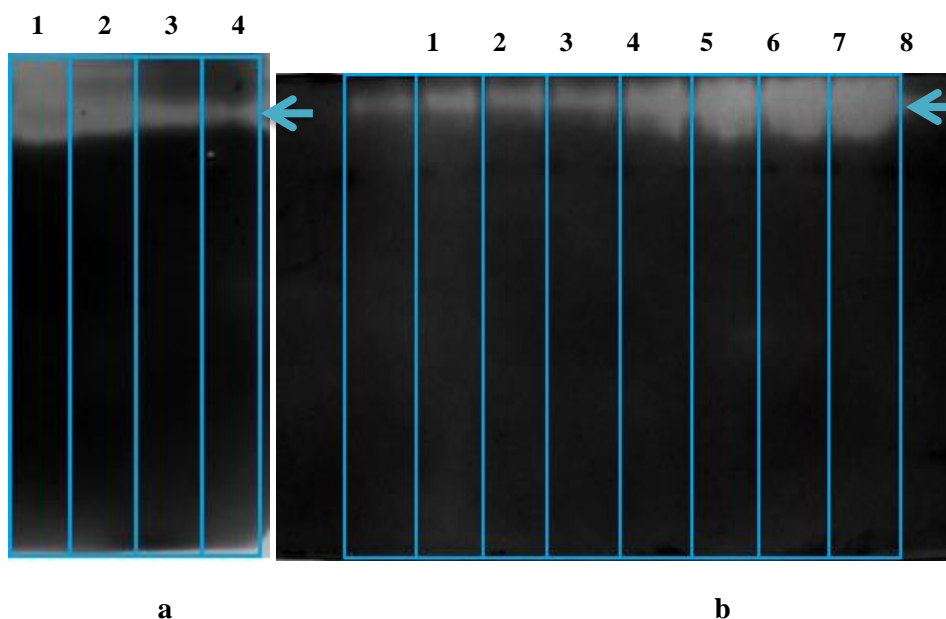
Obrázek 9: Detekce izoenzymů SOD v polyakrylamidovém gelu za nativních podmínek pomocí negativního barvení s NBT. Sloupce označené číslicemi znázorňují zóny s příslušnými vzorky: v zónách 1-4 bylo aplikováno postupně 5 - 20 μ l 10x zředěného extraktu v glycerolu a do jamek v zónách 5-8 aplikováno 5 - 20 μ l neředěného extraktu v glycerolu. Modré šipky ukazují na polohu bandů zmíněných izoenzymů.

4.1.6 Detekce aktivity superoxidodismutasy ve vzorcích včel v polyakrylamidovém gelu

Pro detekci izoenzymů SOD nativní elektroforézou byl použit 10x ředěný a neředěný extrakt z hrudníků v objemech 5-20 μ l. Protože intenzita bandů je v porovnání s komerční SOD nižší, jako vhodnější se pro detekci ukázalo extrakt neředit (obr. 9). Při desetinasobném ředění nebyl detekován žádný izoenzym, naopak v neředěném extraktu byly detekovány 2 izoenzymy.

4.1.7 Detekce aktivity katalasy ve vzorcích včel v polyakrylamidovém gelu

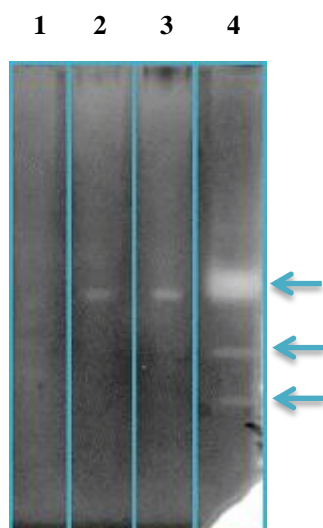
SOD katalyzuje přeměnu superoxidového anionradikálu na peroxid vodíku a kyslík (McCord a Fridovich, 1969), vznikající H_2O_2 je rozkládán na vodu a kyslík vlivem CAT (Aebi, 1984), jejíž zvýšená aktivita je spojována s aktivitou letacích svalů včel, a jež je označována za významnou součást antioxidační odpovědi na včelí let (Williams *et al.*, 2008). Detekce aktivity izoenzymů CAT v polyakrylamidovém gelu za nativních podmínek metodou negativního barvení s DAB byla optimalizována pro komerční preparát CAT z hovězích jater (obr. 10a), poté byla aktivita detekována v extraktu z hrudníků včel (obr. 10b). Byla detekována přítomnost jednoho izoenzymu CAT a je zřejmé, optimální ředění extraktu je 10x a komerčního enzymu 100x.



Obrázek 10a (vlevo), 10b (vpravo): Detekce izoenzymů CAT v polyakrylamidovém gelu za nativních podmínek pomocí negativního barvení s DAB. Sloupce označené číslicemi znázorňují zóny s příslušnými vzorky. Obrázek 10a: detekce izoenzymů komerční CAT, před spuštěním elektroforézy bylo do jamek v zónách 1-4 aplikováno postupně 20 μ l nezředěného, 10x, 100x a 1000x zředěného roztoku enzymu v glycerolu. Obrázek 8b: detekce izoenzymů CAT ve včelím extraktu z hrudníků - před spuštěním elektroforézy bylo do jamek v zónách 1-4 aplikováno postupně 5 - 20 μ l 10x zředěného extraktu v glycerolu a do jamek v zónách 5-8 aplikováno 5 - 20 μ l neředěného extraktu v glycerolu. Modré šipky ukazují na polohu bandů zmíněných izoenzymů CAT.

4.1.8 Detekce aktivity askorbátperoxidasy v polyakrylamidovém gelu

Protože z předchozích měření vyplývá, že aktivita APX je nejvyšší v extraktech ze zadeček, bylo při tomto experimentu pracováno právě s těmito vzorky. Podařilo se detekovat jeden izoenzym APX, který je pozorovatelný nejlépe při extrakci v poměru s extračním činidlem 1:2 (w/v) bez následného ředění (obr. 11). Protože intenzita bandu odpovídajícího danému izoenzymu APX nebyla mnohdy dostatečně výrazná, bylo provedeno srovnání s extraktem z kořene hrachu setého, *Pisum sativum* L., cv. Kudrnáč. Tento extrakt vykazuje při extrakci v poměru s extračním činidlem 1:2 (w/v) bez následného ředění díky vyšší aktivitě APX intenzivnější bandy. Z výsledků detekce tedy vyplývá, že metoda barvení gelů je v rámci detekce aktivity APX úspěšně otestována a pro další měření s extrakty ze včelích zadeček by bylo vhodné aplikovat větší množství vzorku do jamky gelu, případně vhodným způsobem vzorek zakoncentrovat, např. provést extrakci v poměru s extračním činidlem 1:1 (w:v).



Obrázek 11: Detekce izoenzymů APX v polyakrylamidovém gelu za nativních podmínek pomocí negativního barvení s NBT. Sloupce označené číslicemi znázorňují zóny s příslušnými vzorky. Před spuštěním elektroforézy bylo do jamek v zónách 1-4 aplikováno vždy 15 μ l vzorku: sloupec 1 - extrakt ze včelích zadeček (extrakce 1:4, 5x ředěný), sloupec 2 - extrakt ze včelích zadeček (extrakce 1:4, neředěný), sloupec 3 - extrakt ze včelích zadeček (extrakce 1:2, neředěný), sloupec 4 - extrakt z hrachu setého (extrakce 1:2, neředěný). Modré šipky ukazují na polohu bandů izoenzymů APX.

5 Závěr

- V rámci teoretické části bakalářské práce byla vypracována literární rešerše shrnující dostupné poznatky o vzniku ROS enzymovými a neenzymovými mechanismy, o katabolismu ROS a jejich funkci v signálních drahách hmyzu. Zároveň byly shrnuty dostupné poznatky o složkách a funkci enzymových a neenzymových složek antioxidačního systému hmyzu se zaměřením na včelu medonosnou.
- V praktické části bakalářské práce byla zavedena metoda spektrofotometrického stanovení aktivity SOD ve vzorcích včel. Nejvyšší aktivita byla stanovena v hrudnicích, které obsahují létací svaly s vysokými metabolickými nároky během letu a tím i vyšším rizikem vzniku ROS. Vysoká aktivita byla též stanovena v zadečcích, aby se však potvrdila úloha tohoto enzymu v ochraně proti prooxidantům v trávicím traktu včely, je vhodné otestovat aktivitu enzymu v hemolymfě a blíže tak lokalizovat aktivitu SOD. Byla též optimalizována metoda detekce aktivity SOD v polyakrylamidových gelech v nativních podmínkách.
- Byla zavedena metoda spektrofotometrického stanovení aktivity APX ve vzorcích včel. Nejvyšší aktivita byla stanovena v zadečcích, kde se nachází velká část trávicího ústrojí s vyššími nároky na ochranu proti prooxidantům původem z potravy či vznikajícím v průběhu trávení. I v případě tohoto enzymu byla optimalizována detekce aktivity APX v polyakrylamidových gelech v nativních podmínkách. V rámci dalšího zkoumání tohoto enzymu by bylo vhodné objasnit identitu genu a proteinu s APX aktivitou, jelikož doposud u včely nebyla popsána.
- Byl testován vliv teplotního stresu na aktivitu SOD a APX. Statisticky významný rozdíl mezi kontrolními a stresovanými vzorky včel byl zaznamenán v případě SOD u extraktů z hrudníků a v případě APX u extraktů ze zadečků. Při srovnání s podobnými experimenty však literatura mnohdy ukazuje významější rozdíly v aktivitě, je tedy vhodné vliv teplotního stresu na aktivitu zmíněných enzymů dále testovat při různých dobách a teplotách stresu.

6 Literatura

- Aebi H. (1984): Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology* **105**, 121-126.
- Ahmad S. (1992): Biochemical defence of pro-oxidant plant allelochemicals by herbivorous insects. *Biochemical Systematics and Ecology* **20**, 269-296.
- Ahmad S., Beilstein M.A., Pardini R.S. (1989): Glutathione peroxidase activity in insects: a reassessment. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **12**, 31-49.
- Alberts B., Bray D., Johnson A. (1998): *Základy buněčné biologie. Úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vydání, Espero Publishing, Ústí nad Labem, 630 stran.
- Anderson A.D., Patton R.L. (1954): Determination of xanthine oxidase in insects with tetrazolium salts. *Science* **120**, 956-956.
- Ando K., Hirao S., Kabe Y., Ogura Y., Sato I., Yamaguchi Y., Wada T., Handa H. (2008): A new APE1/Ref-1-dependent pathway leading to reduction of NF- κ B and AP-1, and activation of their DNA-binding activity. *Nucleic Acids Research* **36**, 4327-4336.
- Archer C.R., Köhler A., Pirk C.W., Oosthuizen V., Apostolides Z., Nicolson S.W. (2014): Antioxidant supplementation can reduce the survival costs of excess amino acid intake in honeybees. *Journal of Insect Physiology* **71**, 78-86.
- Armstrong G.A., Hearst J.E. (1996): Carotenoids 2: Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry* **10**, 228-237.
- Asada K. (1984): Chloroplasts: Formation of active oxygen and its scavenging. *Methods in Enzymology* **105**, 422-429.
- Baeuerle P.A., Henkel T. (1994): Function and activation of NF- κ B in the immune system. *Annual Review of Immunology* **12**, 141-179.
- Baggiolini M., Wymann M.P. (1990): Turning on the respiratory burst. *Trends in Biochemical Sciences* **15**, 69-72.
- Banerjee A.K., Mandal A., Chanda D., Chakraborti S. (2003): Oxidant, antioxidant and physical exercise. *Molecular and Cellular Biochemistry* **253**, 307-312.
- Barbehenn R.V. (2002): Gut-based antioxidant enzymes in a polyphagous and a graminivorous grasshopper. *Journal of Chemical Ecology* **28**, 1329-1347.
- Barbehenn R.V., Bumgarner S.L., Roosen E.F., Martin M.M. (2001): Antioxidant defenses in caterpillars: role of the ascorbate-recycling system in the midgut lumen. *Journal of Insect Physiology* **47**, 349-357.
- Beard M.E., Holtzman E. (1987): Peroxisomes in wild-type and rosy mutant *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **84**, 7433-7437.
- Beauchamp C., Fridovich I. (1971): Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* **44**, 276-287.
- Becana M., Matamoros M.A., Udvardi M., Dalton D.A. (2010): Recent insights into antioxidant defenses of legume root nodules. *New Phytologist* **188**, 960-976.
- Ben-Ami R. (2011): Innate immunity against moulds: lessons learned from invertebrate models. *Immunological Investigations* **40**, 676-691.
- Bernhardt R. (1995): Cytochrome P450: structure, function, and generation of reactive oxygen species. *Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology* **127**, 137-221.
- Beyer R.E. (1992): An analysis of the role of coenzyme Q in free radical generation and as an antioxidant. *Biochemistry and Cell Biology* **70**, 390-403.
- Biaglow J.E., Mitchell J.B., Held K. (1992): The importance of peroxide and superoxide in the X-ray response. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* **22**, 665-669.
- Böhm F., Edge R., Land E.J., McGarvey D.J., Truscott T.G. (1997): Carotenoids enhance vitamin E antioxidant efficiency. *Journal of the American Chemical Society* **119**, 621-622.
- Boman H.G., Faye I., Gudmundsson G.H., Lee J.Y., Lidholm D.A. (1991): Cell-free immunity in *Cecropia*. A model system for antibacterial proteins. *European Journal of Biochemistry* **201**, 23-31.
- Borba R.S., Klyczek K.K., Mogen K.L., Spivak M. (2015): Seasonal benefits of a natural propolis envelope to honey bee immunity and colony health. *Journal of Experimental Biology* **218**, 3689-3699.

- Bradford M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.
- Browne N., Heelan M., Kavanagh K. (2013): An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes. *Virulence* **4**, 597-603.
- Byun M.S., Jeon K.I., Choi J.W., Shim J.Y., Jue D.M. (2002): Dual effect of oxidative stress on NF- κ B activation in HeLa cells. *Experimental & Molecular Medicine* **34**, 332-339.
- Cadenas E. (1989): Biochemistry of oxygen toxicity. *Annual Review of Biochemistry* **58**, 79-110.
- Canty T.G., Boyle E.M., Farr A., Morgan E.N., Verrier E.D., Pohlman T.H. (1999): Oxidative stress induces NF- κ B nuclear translocation without degradation of I κ B α . *Circulation* **100**, II-361-II-364.
- Çetinus Ş.A., Öztöpe H.N. (2003): Immobilization of catalase into chemically crosslinked chitosan beads. *Enzyme and Microbial Technology* **32**, 889-894.
- Clare D.A., Duong M.N., Darr D., Archibald F., Fridovich I. (1984): Effects of molecular oxygen on detection of superoxide radical with nitroblue tetrazolium and on activity stains for catalase. *Analytical Biochemistry* **140**, 532-537.
- Coon M.J. (2005): Cytochrome P450: nature's most versatile biological catalyst. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **45**, 1-25.
- Corona M., Robinson G.E. (2006): Genes of the antioxidant system of the honey bee: annotation and phylogeny. *Insect Molecular Biology* **15**, 687-701.
- Cotgreave I.A., Moldeus P., Orrenius S. (1988): Host biochemical defense mechanisms against prooxidants. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **28**, 189-212.
- Di Mascio P., Murphy M.E., Sies H. (1991): Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. *The American Journal of Clinical Nutrition* **53**, 194S-200S.
- Ding X., Pernecky S.J., Coon M.J. (1991): Purification and characterization of cytochrome P450 2E2 from hepatic microsomes of neonatal rabbits. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **291**, 270-276.
- Du Y., Ma C.S., Zhao Q.H., Ma G., Yang H.P. (2007): Effects of heat stress on physiological and biochemical mechanisms of insects: a literature review. *Acta Ecologica Sinica* **27**, 1565-1572.
- Dunn P.E. (1990): Humoral immunity in insects. *BioScience* **40**, 738-744.
- Estabrook R.W. (2005): Steroid hydroxylations: a paradigm for cytochrome P450 catalyzed mammalian monooxygenation reactions. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **338**, 290-298.
- Even N., Devaud J.M., Barron A.B. (2012): General stress responses in the honey bee. *Insects* **3**, 1271-1298.
- Felton G.W., Summers C.B. (1995): Antioxidant systems in insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **29**, 187-197.
- Fernie A.R., Tohge T. (2015): Ascorbate biosynthesis: A cross-kingdom history. *Elife* **4**:e07527 <https://elifesciences.org/articles/07527>.
- Fleig R. (1995): Role of the follicle cells for yolk uptake in ovarian follicles of the honey bee *Apis mellifera* L. (*Hymenoptera: Apidae*). *International Journal of Insect Morphology and Embryology* **24**, 427-433.
- Fraaije M.W., Roubroeks H.P., Hagen W.R., Berkel W.J. (1996): Purification and characterization of an intracellular catalase-peroxidase from *Penicillium simplicissimum*. *The FEBS Journal* **235**, 192-198.
- Fridovich I. (2004): Mitochondria: are they the seat of senescence?. *Aging Cell* **3**, 13-16.
- Gallucci S., Matzinger P. (2001): Danger signals: SOS to the immune system. *Current Opinion in Immunology* **13**, 114-119.
- Geller B.L., Winge D.R. (1983): A method for distinguishing Cu, Zn-and Mn-containing superoxide dismutases. *Analytical Biochemistry* **128**, 86-92.
- Gloire G., Legrand-Poels S., Piette J. (2006): NF- κ B activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochemical Pharmacology* **72**, 1493-1505.

- Gloire G., Piette J. (2009): Redox regulation of nuclear post-translational modifications during NF- κ B activation. *Antioxidants & Redox Signaling* **11**, 2209-2222.
- Gray C.J. (1971): *Enzyme-catalysed reactions*. 1. vydání, Van Nostrand Reinhold Company, Londýn, 352 stran.
- Groen A., Lemeer S., van der Wijk T., Overvoorde J., Heck A.J., Ostman A., Barford D., Slijper M., den Hertog J. (2005). Differential oxidation of protein-tyrosine phosphatases. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 10298-10304.
- Gudmundsson G.H., Lidholm D.A., Asling B., Gan R., Boman H.G. (1991): The cecropin locus. Cloning and expression of a gene cluster encoding three antibacterial peptides in *Hyalophora cecropia*. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 11510-11517.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (1985): *Free Radicals in Biology and Medicine*. 1. vydání, Clarendon Press, Oxford, 346 stran.
- Hanukoglu I. (2006): Antioxidant protective mechanisms against reactive oxygen species (ROS) generated by mitochondrial P450 systems in steroidogenic cells. *Drug Metabolism Reviews* **38**, 171-196.
- Havukainen H., Münch D., Baumann A., Zhong S., Halskau Ø., Krogsgaard M., Amdam G.V. (2013): Vitellogenin recognizes cell damage through membrane binding and shields living cells from reactive oxygen species. *Journal of Biological Chemistry* **288**, 28369-28381.
- Hirota K., Matsui M., Iwata S., Nishiyama A., Mori K., Yodoi J. (1997): AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**, 3633-3638.
- Hodgson E.K., Fridovich I. (1975): Interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide. Inactivation of the Enzyme. *Biochemistry* **14**, 5294-5299.
- Hoffmann J.A. (1995): Innate immunity of insects. *Current Opinion in Immunology* **7**, 4-10.
- Hsieh Y.S., Hsu C.Y. (2013): Oxidative stress and anti-oxidant enzyme activities in the trophocytes and fat cells of queen honeybees (*Apis mellifera*). *Rejuvenation Research* **16**, 295-303.
- Hultmark D. (1993): Immune reactions in *Drosophila* and other insects: a model for innate immunity. *Trends in Genetics* **9**, 178-183.
- Chakrabarti P., Rana S., Sarkar S., Smith B., Basu P. (2015): Pesticide-induced oxidative stress in laboratory and field populations of native honey bees along intensive agricultural landscapes in two Eastern Indian states. *Apidologie* **46**, 107-129.
- Chelikani P., Fita I., Loewen P.C. (2004): Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences* **61**, 192-208.
- Chen C.N., Pan S.M. (1996): Assay of superoxide dismutase activity by combining electrophoresis and densitometry. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* **37**, 107-111.
- Chen Q., Vazquez E.J., Moghaddas S., Hoppel C.L., Lesnefsky E.J. (2003): Production of reactive oxygen species by mitochondria central role of complex III. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 36027-36031.
- Chiu S.M., Xue L.Y., Friedman L.R., Oleinick N.L. (1993): Copper ion-mediated sensitization of nuclear matrix attachment sites to ionizing radiation. *Biochemistry* **32**, 6214-6219.
- Jamaluddin M., Wang S., Boldogh I., Tian B., Brasier A.R. (2007): TNF- α -induced NF- κ B/RelA Ser276 phosphorylation and enhanceosome formation is mediated by an ROS-dependent PKAc pathway. *Cellular Signalling* **19**, 1419-1433.
- Kabe Y., Ando K., Hirao S., Yoshida M., Handa H. (2005): Redox regulation of NF- κ B activation: distinct redox regulation between the cytoplasm and the nucleus. *Antioxidants & Redox Signaling* **7**, 395-403.
- Keller L., Jemielity S. (2006): Social insects as a model to study the molecular basis of ageing. *Experimental Gerontology* **41**, 553-556.
- Kelly G.J., Latzko E. (1979): Soluble ascorbate peroxidase. *Naturwissenschaften* **66**, 617-618.
- Kelner M.J., Alexander N.M. (1986): Inhibition of erythrocyte superoxide dismutase by diethyldithiocarbamate also results in oxyhemoglobin-catalyzed glutathione depletion and methemoglobin production. *Journal of Biological Chemistry* **261**, 1636-1641.
- Kil I.S., Kim S.Y., Park J.W. (2008): Glutathionylation regulates I κ B. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **373**, 169-173.

- Kim E.J., Kim H.P., Hah Y.C., Roe J.H. (1996): Differential expression of superoxide dismutases containing Ni and Fe/Zn in *Streptomyces coelicolor*. *The FEBS Journal* **241**, 178-185.
- Kodíček M., Valentová O., Hynek R. (2015): *Biochemie chemický pohled na biologický svět*. 1. vydání, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha, 416 stran.
- Kodrík D., Bednářová A., Zemanová M., Krishnan N. (2015): Hormonal regulation of response to oxidative stress in insects — an update. *International Journal of Molecular Sciences* **16**, 25788-25816.
- Kohno Y., Kitamura S., Yamada T., Sugihara K., Ohta S. (2005): Production of superoxide radical in reductive metabolism of a synthetic food-coloring agent, indigocarmine, and related compounds. *Life Sciences* **77**, 601-614.
- Korayem A.M., Khodairy M.M., Abdel-Aal A.A.A., El-Sonbaty A.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**, B93-B109.
- Korn S.H., Wouters E.F., Vos N., Janssen-Heininger Y.M. (2001): Cytokine-induced activation of nuclear factor- κ B is inhibited by hydrogen peroxide through oxidative inactivation of I κ B kinase. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 35693-35700.
- Krishnan N., Kodrík D. (2006): Antioxidant enzymes in *Spodoptera littoralis* (Boisduval): are they enhanced to protect gut tissues during oxidative stress?. *Journal of Insect Physiology* **52**, 11-20.
- Lacy F., Gough D.A., Schmid-Schönbein G.W. (1998): Role of xanthine oxidase in hydrogen peroxide production. *Free Radical Biology and Medicine* **25**, 720-727.
- Lamb D.C., Waterman M.R. (2013): Unusual properties of the cytochrome P450 superfamily. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **368**:20120434
<http://rstb.royalsocietypublishing.org/content/368/1612/20120434.short>.
- Levy E., Eyal Z., Hochmant A. (1992): Purification and characterization of a catalase-peroxidase from the fungus *Septoria tritici*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **296**, 321-327.
- Lindström-Dinnetz I., Sun S.C., Faye I. (1995): Structure and expression of *Hemolin*, an insect member of the immunoglobulin gene superfamily. *European Journal of Biochemistry* **230**, 920-925.
- Liu Y., Fiskum G., Schubert D. (2002): Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *Journal of Neurochemistry* **80**, 780-787.
- López-Torres M., Barja G. (2008): Lowered methionine ingestion as responsible for the decrease in rodent mitochondrial oxidative stress in protein and dietary restriction: possible implications for humans. *Biochimica et Biophysica Acta* **1780**, 1337-1347.
- Lu F., Chen Q., Chen Z., Lu H., Xu X., Jing, F. (2014): Effects of heat stress on development, reproduction and activities of protective enzymes in *Mononychellus mcgregori*. *Experimental and Applied Acarology* **63**, 267-284.
- Margis R., Dunand C., Teixeira F.K., Margis-Pinheiro M. (2008): Glutathione peroxidase family—an evolutionary overview. *The FEBS journal* **275**, 3959-3970.
- Marklund S., Marklund G. (1974): Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry* **47**, 469-474.
- Matés J.M., Pérez-Gómez C., De Castro I.N. (1999): Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry* **32**, 595-603.
- Mathews M.C., Summers C.B., Felton G.W. (1997): Ascorbate peroxidase: a novel antioxidant enzyme in insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **34**, 57-68.
- Matoušková M., Ruttikay-Nedecký B., Kizek R. (2014): Antioxidační enzymy-biochemické markery oxidačního stresu. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies* **3**, 53-56.
- Matthews J.R., Wakasugi N., Virelizier J.L., Yodoi J., Hay R.T. (1992): Thiordoxin regulates the DNA binding activity of NF- κ B by reduction of a disulphid bond involving cysteine 62. *Nucleic Acids Research* **20**, 3821-3830.

- McCord J.M., Fridovich I. (1969): Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte hemoglobin. *Journal of Biological Chemistry* **244**, 6049-6055.
- Misra H.P., Fridovich I. (1978): Inhibition of superoxide dismutases by azide. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **189**, 317-322.
- Mittler R., Vanderauwera S., Suzuki N., Miller G., Tognetti V.B., Vandepoele K., Gollery M., Shulaev V., Van Breusegem F. (2011): ROS signaling: the new wave?. *Trends in Plant Science* **16**, 300-309.
- Mittler R., Zilinskas B.A. (1993): Detection of ascorbate peroxidase activity in native gels by inhibition of the ascorbate-dependent reduction of nitroblue tetrazolium. *Analytical Biochemistry* **212**, 540-546.
- Moreno-García M., Recio-Tótoro B., Claudio-Piedras F., Lanz-Mendoza H. (2014): Injury and immune response: applying the danger theory to mosquitoes. *Frontiers in Plant Science* **5**:451 <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2014.00451/full>.
- Morgan M.J., Liu, Z.G. (2011): Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. *Cell Research* **21**, 103.
- Muller F.L., Liu Y., Van Remmen H. (2004): Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 49064-49073.
- Muraoka S., Enomoto H., Sugiyama M., Yamasaki H. (1967): The mechanism of the reduction of cytochrome c by xanthine oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* **143**, 408-415.
- Nakano Y., Asada K. (1981): Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* **22**, 867-880.
- Nakashima I., Kato M., Akhand A.A., Suzuki H., Takeda K., Hossain K., Kawamoto Y. (2002): Redox-linked signal transduction pathways for protein tyrosine kinase activation. *Antioxidants and Redox Signaling* **4**, 517-531.
- Nam H.J., Jang I.H., You H., Lee K.A., Lee W.J. (2012): Genetic evidence of a redox-dependent systemic wound response via Hyan protease-phenoloxidase system in *Drosophila*. *The EMBO Journal* **31**, 1253-1265.
- Nappi A.J., Vass E. (1993): Melanogenesis and the generation of cytotoxic molecules during insect cellular immune reactions. *Pigment Cell & Melanoma Research* **6**, 117-126.
- Neuhoff V., Stamm R., Eibl H. (1985): Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: a systematic analysis. *Electrophoresis* **6**, 427-448.
- Neven L.G. (2000): Physiological responses of insects to heat. *Postharvest Biology and Technology* **21**, 103-111.
- Nikolić T.V., Purać J., Orčić S., Kojić D., Vujanović D., Stanimirović Z., Gržetić I., Ilijević K., Šikoparija B., Blagojević D.P. (2015): Environmental effects on superoxide dismutase and catalase activity and expression in honey bee. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **90**, 181-194.
- Nishi T., Shimizu N., Hiramoto M., Sato I., Yamaguchi Y., Hasegawa M., Aizawa S., Tanaka H., Kataoka K., Watanabe H., Handa H. (2002): Spatial redox regulation of a critical cysteine residue of NF- κ B *in vivo*. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 44548-44556.
- Nohl H., Kozlov A.V., Gille L., Staniek K. (2003): Cell respiration and formation of reactive oxygen species: facts and artefacts. *Biochemical Society Transactions* **31**, 1308-1311.
- Nowak D.E., Tian B., Jamaluddin M., Boldogh I., Vergara L.A., Choudhary S., Brasier A.R. (2008): RelA Ser276 phosphorylation is required for activation of a subset of NF- κ B-dependent genes by recruiting cyclin-dependent kinase 9/cyclin T1 complexes. *Molecular and Cellular Biology* **28**, 3623-3638.
- Oeckinghaus A., Ghosh S. (2009): The NF- κ B family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **1**, 1-14.
- Okada S., Kanematsu S., Asada K. (1979): Intracellular distribution of manganese and ferric superoxide dismutases in blue-green algae. *FEBS letters* **103**, 106-110.
- Panopoulos A., Harraz M., Engelhardt J.F., Zandi E. (2005): Iron-mediated H₂O₂ production as a mechanism for cell type-specific inhibition of tumor necrosis factor α -induced but not

- interleukin-1 β -induced I κ B kinase complex/nuclear factor- κ B activation. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 2912-2923.
- Paoletti F., Aldinucci D., Mocali A., Caparrini A. (1986): A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase activity in tissue extracts. *Analytical Biochemistry* **154**, 536-541.
- Paulsen C.E., Carroll K.S. (2009): Orchestrating redox signaling networks through regulatory cysteine switches. *ACS Chemical Biology* **5**, 47-62.
- Pereira L.S., Oliveira P.L., Barja-Fidalgo C., Daffre S. (2001): Production of reactive oxygen species by hemocytes from the cattle tick *Boophilus microplus*. *Experimental Parasitology* **99**, 66-72.
- Perkins N.D., Gilmore T.D. (2006): Good cop, bad cop: the different faces of NF- κ B. *Cell Death and Differentiation* **13**, 759-772.
- Pitkänen S., Robinson B.H. (1996): Mitochondrial complex I deficiency leads to increased production of superoxide radicals and induction of superoxide dismutase. *The Journal of Clinical Investigation* **98**, 345-351.
- Racek J., Holeček V. (1999): Enzymy a volné radikály. *Chemické listy* **93**, 774-780.
- Rada B., Leto T.L. (2008): Oxidative innate immune defenses by Nox/Duox family NADPH oxidases. *Trends in Innate Immunity* **15**, 164-187.
- Raha S., McEachern G.E., Myint A.T., Robinson B.H. (2000): Superoxides from mitochondrial complex III: the role of manganese superoxide dismutase. *Free Radical Biology and Medicine* **29**, 170-180.
- Reynaert N.L., van der Vliet A., Guala A.S., McGovern T., Hristova M., Pantano C., Heintz N.H., Heim J., Ho S.Y., Matthews D.E., Wouters E.F., Janssen-Heininger Y. M. (2006): Dynamic redox control of NF- κ B through glutaredoxin-regulated S-glutathionylation of inhibitory κ B kinase β . *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 13086-13091.
- Roberts S.P., Harrison J.F. (1998): Mechanisms of thermoregulation in flying bees. *American Zoologist* **38**, 492-502.
- Roberts S.P., Harrison J.F. (1999): Mechanisms of thermal stability during flight in the honeybee, *Apis mellifera*. *Journal of Experimental Biology* **202**, 1523-1533.
- Robinson G.E., Vargo E.L. (1997): Juvenile hormone in adult eusocial *Hymenoptera*: gonadotropin and behavioral pacemaker. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **35**, 559-583.
- 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 of the United States of America* **103**, 962-967.
- Shigeoka S., Nakano Y., Kitaoka S. (1980): Metabolism of hydrogen peroxide in *Euglena gracilis* Z by L-ascorbic acid peroxidase. *Biochemical Journal* **186**, 377-380.
- Schieven G.L., Kirihara J.M., Myers D.E., Ledbetter J.A., Uckun F.M. (1993): Reactive oxygen intermediates activate NF- κ B in a tyrosine kinase-dependent mechanism and in combination with vanadate activate the p56lck and p59fyn tyrosine kinases in human lymphocytes. *Blood* **82**, 1212-1220.
- Schoonbroodt S., Ferreira V., Best-Belpomme M., Boelaert J.R., Legrand-Poels S., Korner M., Piette J. (2000): Crucial role of the amino-terminal tyrosine residue 42 and the carboxyl-terminal PEST domain of I κ B α in NF- κ B activation by an oxidative stress. *The Journal of Immunology* **164**, 4292-4300.
- Smith J., Shrift A. (1979): Phylogenetic distribution of glutathione peroxidase. *Comparative Biochemistry and Physiology. B, Comparative Biochemistry* **63**, 39-44.
- Sohal R.S., Weindruch R. (1996): Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* **273**, 59-63.
- Sørensen J.G., Dahlggaard J., Loeschcke V. (2001): Genetic variation in thermal tolerance among natural populations of *Drosophila buzzatii*: down regulation of Hsp70 expression and variation in heat stress resistance traits. *Functional Ecology* **15**, 289-296.
- Stiborová M., Hudeček J., Hodek P., Frei E. (1999): Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chemické listy* **93**, 229-237.

- Suarez R.K., Staples J.F., Lighton J.R.B. (1999): Turnover rates of mitochondrial respiratory chain enzymes in flying honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of Experimental Zoology* **284**, 1-6.
- Sugumaran M. (2002): Comparative biochemistry of eumelanogenesis and the protective roles of phenoloxidase and melanin in insects. *Pigment Cell & Melanoma Research* **15**, 2-9.
- Summers C.B., Felton G.W. (1993): Antioxidant role of dehydroascorbic acid reductase in insects. *Biochimica et Biophysica Acta* **1156**, 235-238.
- Sun S.C., Asling B., Faye I. (1991b): Organization and expression of the immunoresponsive lysozyme gene in the giant silk moth, *Hyalophora cecropia*. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 6644-6649.
- Sun S.C., Faye I. (1992): Cecropia immunoresponsive factor, an insect immunoresponsive factor with DNA-binding properties similar to nuclear-factor κ B. *European Journal of Biochemistry* **204**, 885-892.
- Sun S.C., Faye I. (1995): Transcription of immune genes in the giant silkworm, *Hyalophora cecropia*, is augmented by H₂O₂ and diminished by thiol reagents. *European Journal of Biochemistry* **231**, 93-98.
- Sun S.C., Lindström I., Lee J.Y., Faye I. (1991a): Structure and expression of the attacin genes in *Hyalophora cecropia*. *European Journal of Biochemistry* **196**, 247-254.
- Takada Y., Mukhopadhyay A., Kundu G.C., Mahabeleshwar G.H., Singh S., Aggarwal B.B. (2003): Hydrogen peroxide activates NF- κ B through tyrosine phosphorylation of I κ B α and serine phosphorylation of p65: evidence for the involvement of I κ B α kinase and Syk protein-tyrosine kinase. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 24233-24241.
- Tojo S., Naganuma F., Arakawa K., Yokoo S. (2000): Involvement of both granular cells and plasmatocytes in phagocytic reactions in the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *Journal of Insect Physiology* **46**, 1129-1135.
- Toledano M.B., Ghosh D., Trinh F., Leonard W.J. (1993): N-terminal DNA-binding domains contribute to differential DNA-binding specificities of NF- κ B p50 and p65. *Molecular and Cellular Biology* **13**, 852-860.
- Toledano M.B., Leonard W.J. (1991): Modulation of transcription factor NF- κ B binding activity by oxidation-reduction *in vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **88**, 4328-4332.
- Tsang E.W., Bowler C., Hérouart D., Van Camp W., Villarroel R., Genetello C., van Montagu M., Inze D. (1991): Differential regulation of superoxide dismutases in plants exposed to environmental stress. *The Plant Cell* **3**, 783-792.
- Tufail M., Takeda M. (2008): Molecular characteristics of insect vitellogenins. *Journal of Insect Physiology* **54**, 1447-1458.
- Veal E.A., Day A.M., Morgan B.A. (2007): Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Molecular Cell* **26**, 1-14.
- Veal E.A., Toone W.M., Jones N., Morgan B.A. (2002): Distinct roles for glutathione S-transferases in the oxidative stress response in *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 35523-35531.
- Weidinger A., Kozlov A.V. (2015): Biological activities of reactive oxygen and nitrogen species: oxidative stress versus signal transduction. *Biomolecules* **5**, 472-484.
- Weinhold L.C., Ahmad S., Pardini R.S. (1990): Insect glutathione-S-transferase: a predictor of allelochemical and oxidative stress. *Comparative Biochemistry and Physiology. B, Comparative Biochemistry* **95**, 355-363.
- Weirich G.F., Collins A.M., Williams V.P. (2002): Antioxidant enzymes in the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie* **33**, 3-14.
- Weisiger R.A., Fridovich I. (1973): Superoxide dismutase organelle specificity. *Journal of Biological Chemistry* **248**, 3582-3592.
- 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**, 538-549.

- Wolfe-Simon F., Starovoytov V., Reinfelder J.R., Schofield O., Falkowski P.G. (2006): Localization and role of manganese superoxide dismutase in a marine diatom. *Plant Physiology* **142**, 1701-1709.
- Wu M., Bian Q., Liu Y., Fernandes A.F., Taylor A., Pereira P., Shang F. (2009): Sustained oxidative stress inhibits NF- κ B activation partially via inactivating the proteasome. *Free Radical Biology and Medicine* **46**, 62-69.
- Young A.J., Lowe G.M. (2001): Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **385**, 20-27.
- Zámocký M., Köller F. (1999): Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and *in vitro* mutagenesis. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **72**, 19-66.
- Zelko I.N., Mariani T.J., Folz R.J. (2002): Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology and Medicine* **33**, 337-349.
- Zhong H., May M.J., Jimi E., Ghosh S. (2002): The phosphorylation status of nuclear NF- κ B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1. *Molecular Cell* **9**, 625-636.
- Zhong H., Voll R.E., Ghosh S. (1998): Phosphorylation of NF- κ B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300. *Molecular Cell* **1**, 661-671.

7 Seznam použitých zkratek

AA	akrylamid
APS	persíran amonný
APX	askorbátperoxidasa
BIS	N,N'-methylen-bisakrylamid
BSA	hovězí sérový albumin
CAT	katalasa
CBB	Coomassie Brilliant Blue
CBP	CREB-binding protein
CIF	<i>Cecropia</i> imunoresponsivní faktor
DAB	diaminobenzidin
DHA	dehydroaskorbát
DHAR	dehydroaskorbátreduktasa
DIF	<i>Drosophila</i> imunoresponsivní faktor
GSH	redukovaný glutathion
GSSG	oxidovaná forma glutathionu
IKK	kinasa fosforylující I κ B
JNK	c-Jun N-terminální kinasy
MDHA	monodehydroaskorbát
NBT	nitrotetrazoliová modř
PKAc	katalytická podjednotka cAMP–dependentní proteinkinasy
PO	fenoloxidasa
PPO	profenoloxidasa
RelA	podjednotka A heterodimeru NF- κ B
RHD	Rel homologní doména transkripčního faktoru NF- κ B
SOD	superoxiddismutasa
TEMED	tetramethylethylendiamin
TRX	thioredoxin
XO	xantinoxidasa