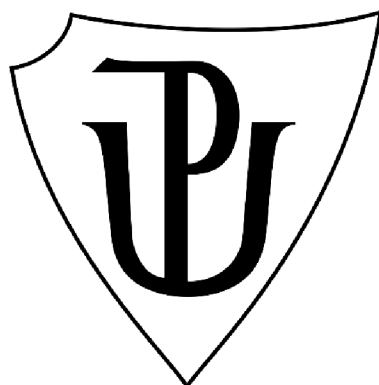


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Reaktivní formy kyslíku a oxidační stres u včely medonosné (*Apis mellifera*)

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Kateřina Králová
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Martina Janků
Rok:	2022

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

V Olomouci dne

.....

Podpis studenta

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucí mé bakalářské práce Mgr. Martině Janků za její vstřícný přístup, především za trpělivost, také za cenné rady a pomoc při sepsání teoretické i experimentální části a při práci v laboratoři. Chtěla bych také poděkovat Katedře biochemie Univerzity Palackého za poskytnutí prostor pro práci na mé experimentální části. Dále bych chtěla poděkovat panu Mgr. Jiřímu Danihlíkovi, Ph.D. a panu prof. Mgr. Marku Petřivalskému, Dr. za cenné rady. A v neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině za jejich podporu.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Kateřina Králová
Název práce	Reaktivní formy kyslíku a oxidační stres u včely medonosné (<i>Apis mellifera</i>)
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Martina Janků
Rok obhajoby práce	2022

Abstrakt

Včela medonosná (*Apis mellifera*) je nejvýznamnější opylovatel na světě. Značný vliv na kvalitu a délku života včel mají stresové faktory, které jsou mimo jiné zodpovědné za nadměrnou tvorbu reaktivních forem kyslíku (ROS) vyvolávajících oxidační stres. Oxidační stres je popsán jako nerovnováha mezi produkcí ROS a kapacitou antioxidačního systému buňky ve prospěch tvorby ROS. Projevuje se oxidačním poškozením biomolekul, jako jsou lipidy, DNA a proteiny, což může mít pro organismus fatální dopad.

V teoretické části bakalářské práce byla shrnuta tvorba ROS a charakterizován antioxidační systém živých organismů, který chrání buňky před negativními účinky ROS. Dále byla shrnuta signální role ROS v živých organismech a také byl popsán negativní účinek ROS vedoucí k oxidačnímu poškození biomolekul. Jednotlivé kapitoly byly popsány obecně u živých organismů a se zaměřením na včelu medonosnou. V poslední kapitole teoretické části byly popsány metody pro stanovení oxidačního poškození proteinů, respektive karbonylovaných proteinů, s využitím interakce s 2,4-dinitrofenylhydrazinem.

V experimentální části byla provedena oxidace hovězího sérového albuminu (BSA) a byla sestavena kalibrační křivka karbonylovaného BSA. Dále byla provedena optimalizace spektrofotometrického stanovení karbonylovaných proteinů pro včelí extrakty a byla stanovena koncentrace karbonylovaných proteinů u včel ošetřených paraquatem, což je činidlo vyvolávající oxidační stres.

Klíčová slova	ROS, <i>Apis mellifera</i> , antioxidační systém, oxidační poškození, karbonylace proteinů, spektrofotometrické stanovení, 2,4-dinitrofenylhydrazin
Počet stran	82
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Kateřina Králová
Title	Reactive oxygen species and oxidative stress in honey bee (<i>Apis mellifera</i>)
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Martina Janků
The year of presentation	2022

Abstract

The honeybee (*Apis mellifera*) is the most important pollinator in the world. Stress factors have a considerable influence on the quality and life expectancy of bees, which are, among other things, responsible for the excessive formation of reactive oxygen species (ROS) causing oxidative stress. Oxidative stress is described as an imbalance between the production of ROS and the capacity of the cell's antioxidant system in favour of the formation of ROS. It is manifested by oxidative damage to biomolecules such as lipids, DNA and proteins, which can have a fatal impact on the organism.

In the theoretical part of the bachelor thesis, the formation of ROS is summarised and the antioxidant system of living organisms, which protects cells from the negative effects of ROS, is characterized. Furthermore, the signal role of ROS in living organisms was summarized and the negative effect of ROS leading to oxidative damage of biomolecules was also described. Individual chapters were described in general in living organisms and with a focus on the honeybee. In the last chapter of the theoretical part, methods for determining oxidative damage of proteins, respectively carbonylated proteins, were described using interaction with 2,4-dinitrophenylhydrazine.

In the experimental part, oxidation of bovine serum albumin (BSA) was performed and a calibration curve of carbonylated BSA was compiled. Furthermore, spectrophotometric determination of carbonylated proteins for bee extracts was optimized and the concentration of carbonylated proteins was determined in bees treated with paraquat, an oxidizing stress agent.

Keywords	ROS, <i>Apis mellifera</i> , antioxidant system, oxidative damage, protein carbonylation, spectrophotometric assay, 2,4-dinitrophenylhydrazine
Number of pages	82
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

1	ÚVOD	1
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	2
2.1	<i>Apis mellifera</i>	3
2.2	Charakterizace reaktivních forem kyslíku	4
2.2.1	Enzymové zdroje ROS	6
2.2.2	Neenzymové zdroje ROS	7
2.2.2.1	Tvorba ROS zprostředkovaná kovy	8
2.2.3	Produkce ROS u včely medonosné	9
2.3	ANTIOXIDAČNÍ SYSTÉM	10
2.3.1	Antioxidační enzymy	10
2.3.1.1	Antioxidační enzymy u včely medonosné	11
2.3.1.2	Superoxiddismutasa	12
2.3.1.3	Katalasa	14
2.3.1.4	Peroxidasy	16
2.3.1.5	Glutathion-S-transferasa	18
2.3.1.6	Zapojení antioxidačních systémů do fyziologických pochodů u včely medonosné	19
2.3.2	Neenzymové antioxidanty	20
2.3.2.1	Glutathion	20
2.3.2.2	Vitamin C	21
2.3.2.3	Vitamin E	22
2.3.2.4	Karotenoidy	22
2.3.2.5	Neenzymové antioxidanty vyskytující se u včel	23
2.4	SIGNÁLNÍ ROLE ROS V BUŇCE	24
2.5	OXIDAČNÍ POŠKOZENÍ	25
2.5.1	Oxidační poškození DNA	26
2.5.2	Peroxidace lipidů	28
2.5.3	Karbonylace proteinů	30
2.6	METODY STANOVENÍ KARBONYLACE PROTEINŮ	33
2.6.1	Spektrofotometrické stanovení karbonylace proteinů	35
2.6.1.1	Stanovení proteinů separovaných HPLC	39
2.6.2	Imunochemické metody pro stanovení karbonylace proteinů	40
2.6.2.1	Stanovení karbonylovaných proteinů metodou Western blot	40
2.6.2.2	Stanovení karbonylovaných proteinů metodou ELISA	43
2.6.3	Hmotnostní spektrometrické stanovení karbonylace proteinů	45
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	47

3.1	Materiál a přístroje	47
3.1.1	Chemikálie	47
3.1.2	Biologický materiál	47
3.1.3	Instrumentace a pomůcky	48
3.1	Metody	48
3.1.1	Stanovení koncentrace celkových proteinů metodou dle Bradforda	48
3.1.1.1	Příprava roztoků	48
3.1.1.2	Stanovení kalibrační křivky	49
3.1.2	Oxidace hovězího sérového albuminu	50
3.1.2.1	Příprava roztoků	50
3.1.2.2	Oxidace BSA	51
3.1.3	Levinova metoda pro stanovení karbonylovaného BSA a sestavení kalibrační křivky karbonylovaného BSA	52
3.1.3.1	Příprava roztoků	52
3.1.3.2	Stanovení karbonylovaného BSA Levinovou metodou	53
3.1.3.3	Sestavení kalibrační křivky karbonyl-BSA	53
3.1.4	Příprava extraktů včel	54
3.1.4.1	Příprava roztoků	54
3.1.4.2	Příprava včel	54
3.1.4.3	Příprava včelích extraktů	55
3.1.5	Levinova metoda pro stanovení karbonylovaných proteinů ve včelích vzorcích	55
3.1.5.1	Stanovení karbonylovaných proteinů Levinovou metodou	55
4	DISKUZE A VÝSLEDKY	56
4.1	Stanovení koncentrace celkových proteinů metodou dle Bradforda	56
4.2	Oxidace hovězího sérového albuminu	56
4.3	Provedení Levinovy metody s karbonylovaným BSA	58
4.3.1	Sestavení kalibrační křivky karbonylovaného BSA po provedení Levinovy metody	62
4.4	Příprava a extrakce včelích vzorků	63
4.5	Levinova metoda pro stanovení karbonylovaných proteinů ve včelích vzorcích	63
4.5.1	Stanovení karbonylovaných proteinů ve včelích vzorcích ošetřených paraquatem	67
5	ZÁVĚR	71
6	LITERATURA	72
6.1	Použitý software	81
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	82

Cíle práce

- Zpracování literární rešerše shrnující obecnou charakteristiku reaktivních forem kyslíku (ROS) v živých organismech a v zaměření na úlohu ROS v rámci imunitního systému hmyzu.
- Shrnutí poznatků o antioxidačním systému hmyzu se zaměřením na včelu medonosnou.
- Charakteristika oxidačního stresu a oxidačních poškození způsobených ROS se zaměřením na karbonylaci proteinů a oxidační poškození DNA.
- Zavedení a optimalizace metod pro stanovení karbonylovaných proteinů.

1 ÚVOD

Včela medonosná (*Apis mellifera*) je jedním z nejdůležitějších zástupců hmyzu na světě. Díky činnosti včel dochází k opylování velké části rostlin. V posledních letech ale počet aktivních včelstev klesá, a to v důsledku rozsáhlých úhynů včel. Důvodem je kombinace několika faktorů, včetně patogenů způsobujících onemocnění včel a dalších stresových podmínek, zásahů včelařů nebo působení pesticidů používaných k ošetření plodin (de Mattos et al., 2018). Tyto faktory u včel mimo jiné vedou i ke vzniku oxidačního stresu, který má na jejich zdraví a vitalitu rovněž negativní dopad (Janků et al., 2019).

Reaktivní formy kyslíku (ROS) jsou vysoce reaktivní látky radikálové nebo neradikálové povahy, které mají původ v molekulárním kyslíku. ROS se tvoří v rámci bazálního metabolismu a pokud je hladina ROS na fyziologické úrovni, jedná se o důležitou složku signálních pochodů v buňce (Pospíšil et al., 2019). Když ale na včelu působí stresové faktory, jako jsou například patogeny či pesticidy, dochází ke zvýšení produkce ROS (de Mattos et al., 2018). Dalším faktorem je to, že u létavek se zvyšuje produkce ROS kvůli namáhavým letům mimo úl (Margotta et al., 2018). Negativním účinkům ROS čelí organismus pomocí antioxidačního systému, který rozkládá reaktivní formy kyslíku na netoxické molekuly a eliminuje oxidační poškození důležitých biomolekul (Pospíšil et al., 2019). Když hladina ROS značně přesáhne kapacitu antioxidačního systému, dochází k poškození biomolekul v buňce a nastává tzv. oxidační stres (Birben et al., 2012).

Oxidační stres se projevuje hromaděním ROS v buňkách a vznikem poškození biomolekul v procesech jako je peroxidace lipidů, karbonylace proteinů a oxidační poškození DNA. Takto poškozené biomolekuly nejsou schopny vykonávat své funkce v buňce a dochází k poškození organismu, které je spojováno s řadou patofyziologických procesů a může mít pro organismus fatální dopad (Birben et al., 2012; Pospíšil et al., 2019).

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Reaktivní formy kyslíku, nesoucí zkratku ROS z anglického *reactive oxygen species*, jsou běžně tvořeny jako vedlejší produkt buněčného metabolismu živých organismů. ROS jsou chemická individua, která jsou reaktivnější než molekulární kyslík a snadno tak reagují se svým okolím, například s biomolekulami živých organismů. Můžeme je dělit do dvou hlavních skupin, a to na ROS radikálové a neradikálové povahy. Volný radikál je chemická částice, která má ve své valenční sféře alespoň jeden nepárový elektron (Pospíšil et al., 2019). Mezi radikálové ROS patří radikál superoxidového aniontu ($\cdot\text{O}_2^-$, také označován jako superoxidový anion radikál), hydroxylový radikál ($\cdot\text{OH}$), alkoxylový radikál ($\text{RO}\cdot$), peroxylový radikál ($\text{ROO}\cdot$) a hydroperoxylový radikál ($\text{HOO}\cdot$) (Birben et al., 2012; Trnková et al., 2015). K neradikálovým ROS se řadí peroxid vodíku (H_2O_2), ozon (O_3), singletový kyslík ($^1\text{O}_2$) a kyselina chlorná (HClO) (Chaitanya et al., 2016).

ROS zaujímají v živých organismech rozmanité funkce, které mohou být pro buňky buď prospěšné nebo škodlivé podle toho, v jakém množství jsou přítomny. Jestliže jsou v buňce zastoupeny v nízké koncentraci, jsou nepostradatelnou složkou buněčné signalizace a podílí se na obraně proti patogenním mikroorganismům. Pokud však dojde k jejich produkci v nadměrném množství, např. při zvýšených požadavcích na okysličování organismu nebo při vnějším stimulu imunitního systému (stresové faktory, pesticidy) a současně není dostatečně účinný antioxidační systém buňky, který má za úkol ROS udržovat ve fyziologických hladinách, dochází k interakci ROS s buněčnými biomolekulami. Tato interakce vede k jejich oxidačnímu poškození způsobujícímu následnou degradaci tkání živočichů nebo pletiv rostlin, které může vést až k usmrcení daného organismu. Tento proces, který sestává z nerovnováhy mezi produkcí a odbouráváním ROS, jejímž důsledkem je buněčné poškození, nazýváme oxidační stres (Orčić et al., 2017).

Jako ochrana před oxidačním stresem, tedy negativním účinkem ROS, slouží v živém organismu antioxidační systém. Složky antioxidačního systému můžeme rozdělit na antioxidanty enzymové a neenzymové. Ve složení enzymových antioxidantů se jedná o proteiny, resp. enzymy, které katalyzují přeměnu anebo degradaci ROS na metabolity pro organismus netoxické jako je např. kyslík nebo voda (Birben et al., 2012). Neenzymové antioxidanty jsou nízkomolekulární látky, které z velké části degradují ROS

chemickou reakcí, při níž dochází k redukci ROS a oxidaci antioxidantů (Nandi et al., 2019).

2.1 *Apis mellifera*

Včely jsou jedním z nejvýznamnějších opylovatelů na světě. Včela medonosná (*Apis mellifera*) se řadí mezi sociální hmyz, podobně jako mravenci nebo termiti (Wojciechowski et al., 2018). To znamená, že včely žijí v koloniích, v nichž vzájemně kooperují, mají jednu matku, pečují o své potomstvo, provádějí rozličné úkony a přes zimu přežívají z uložené potravy (Rand et al., 2015; Kramer et al., 2021).

Kolonie včely medonosné sestává ze tří kast - dvě samičí a jedna samčí, přesněji matka, dělnice a trubci. Matky jsou morfologicky odlišné od dělnic (Wojciechowski et al., 2018). Matka je největší a má podlouhlý zadeček. Ve včelstvu je pouze jedna a jako jediná je schopna reprodukce (De Souza et al., 2018; Wojciechowski et al., 2018). Trubci jsou menší než matka, líhnou se jen v letním období a jejich účelem je oplodnit matku, poté hynou (Rassnigg & Railsheim, 2005). Dělnice jsou nejmenší a ve včelstvu nejpočetnější kastou. Kasty se liší i délkou vývoje plodu, než se vylíhne jedinec. Dělnice si dělí práci v úlu podle svého stáří. V prvních dvaceti dnech svého života jsou uklízečky, krmičky, kojičky, stavitelky a strážkyně. Poté se z dělnice stává létavka a lety mimo úl shání potravu jako je nektar a pyl (Rassnigg & Railsheim, 2005; De Souza et al., 2018).

Včelstvo se dělí podle ročního období na letní a zimní generaci včel, která se různí délkou života dělnic a počtem včel ve včelstvu. Letní generace včel čítá okolo 15 000 až 60 000 včel s krátkým životním cyklem dělnic. Dělnice se dožívají 30-40 dnů, matka žije i několik let. Zimní generace včel není tak početná, zato přežívá i několik měsíců (Berenbaum & Johnson, 2015; Dostálková et al., 2021).

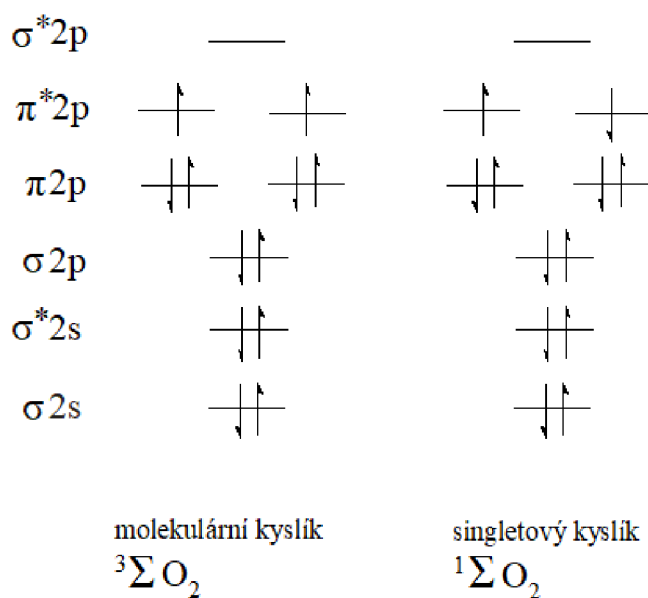
V posledních letech dochází ke snížení počtu včelích kolonií. Jedním z důvodů mohou být patogeny způsobující onemocnění včelstev nebo působení stresových faktorů, které mají za následek také nadměrnou produkci ROS, která může mimo jiné ovlivňovat i urychlení stárnutí včelích jedinců (Orčić et al., 2017).

Vzhledem ke své důležitosti pro společnost a přírodu je včela medonosná častým subjektem výzkumů. Zkoumá se vliv patogenů, průmyslově ošetřených plodin, zásahy včelaře do včelstva a různé stresové faktory, které mohou přispívat k úhynu včel (Münch et al., 2008).

2.2 Charakterizace reaktivních forem kyslíku

Reaktivní formy kyslíku vznikají z molekulárního kyslíku excitací elektronu nebo enzymovými či neenzymovými drahami. Nejabundantnějšími ROS jsou superoxidový anion radikál, hydroxylový radikál, hydroperoxylový radikál, peroxid vodíku a singletový kyslík (Sies & Jones, 2020).

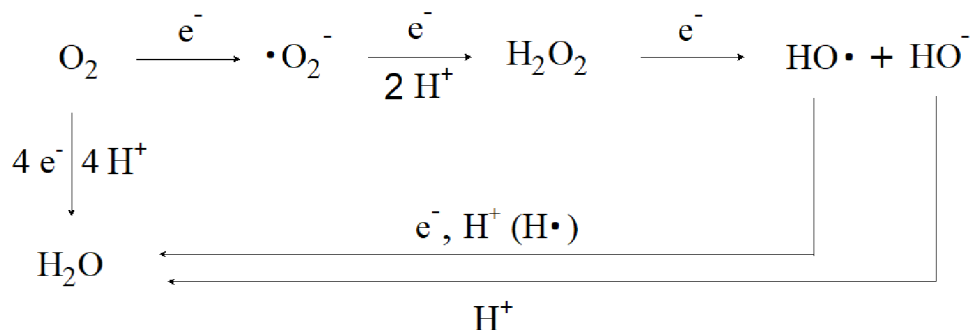
Kyslík je ve svém molekulárním stavu (O_2) poměrně málo reaktivní. Jeho reaktivnější forma, singletový kyslík (1O_2) vzniká absorpcí energie s následným obrácením spinu jeho nepárového elektronu (Obr. 1). Tato forma vzniká při buněčných procesech jako je například fotosyntéza nebo respirace. Zpět na stabilnější formu může být singletový kyslík navrácen např. reakcí s β -karoteny, které jsou součástí neenzymového antioxidačního systému buňky (Schlothauer, 2013).



Obrázek 1: Rozložení elektronů v molekulovém orbitalu molekulárního a singletového kyslíku. Převzato z: (Štípek, 2000); vytvořeno pomocí ChemSketch.

Tvorba superoxidového anion radikálu může probíhat spontánními i enzymy katalyzovanými reakcemi (Fridovich, 1997). Mezi spontánní reakci vzniku $\cdot O_2^-$ lze zařadit jedoelektronovou redukcí molekulárního kyslíku, která probíhá v mitochondriích v respiračním řetězci (Obr. 2). Dalšími možnostmi tvorby $\cdot O_2^-$ jsou enzymové reakce katalyzované nikotinamidadenindinukleotidfosfát oxidasou (NADPH oxidasa, EC 1.6.3.1) a xanthin oxidasou (XO, EC 1.1.3.22) (Birben et al., 2012). Superoxidový radikál má krátký poločas života (2-4 μs) a nedokáže přejít přes buněčnou

membránu (Piterková et al., 2005). $\cdot\text{O}_2^-$ se řadí mezi méně reaktivní ROS. Škodlivý efekt $\cdot\text{O}_2^-$ spočívá především v protonaci $\cdot\text{O}_2^-$ za tvorby reaktivnějšího $\cdot\text{OOH}$ (Pospíšil et al., 2019).



Obrázek 2: Schéma jednoelektronové a čtyřelektronové redukce kyslíku. Molekulární kyslík v mitochondriích podléhá čtyřelektronové redukci za tvorby vody. Může ale docházet i k redukci jedním elektronem, při níž dochází k tvorbě superoxidového radikálu ($\cdot\text{O}_2^-$), ze kterého navazujícími redukčními reakcemi může dojít ke vzniku peroxidu vodíku (H_2O_2) a hydroxylovému radikálu ($\cdot\text{OH}$). Převzato z: (Lushchak, 2014). Vytvořeno v ChemSketch.

Peroxid vodíku je oproti jiným ROS relativně stabilní molekula, která je schopna procházet biologickými membránami. Pokud se koncentrace peroxidu vodíku v buňce pohybuje na fyziologické hladině, slouží H_2O_2 jako posel v buněčné signalizaci. V přítomnosti přechodných kovů (Fe^{2+} , Cu^+) reaguje H_2O_2 ve Fentonově reakci za oxidace příslušného kovu a vzniku hydroxylového radikálu a hydroxidového aniontu (Piterková et al., 2005).

Hydroxylový radikál je považován za velmi reaktivní částici. Příčinou vysoké reaktivity $\cdot\text{OH}$ je přítomnost nepárového elektronu a pozitivního redoxního potenciálu (Pospíšil et al., 2019). Tyto vlastnosti způsobují, že hydroxylový radikál snadno reaguje se svým okolím, a to převážně v blízkosti jeho vzniku. Vysoká reaktivita $\cdot\text{OH}$ je důvodem jeho krátkého poločasu života ($< 1 \mu\text{s}$) (Piterková et al., 2005). Hydroxylové radikály způsobují oxidační poškození biomolekul jako jsou lipidy, proteiny nebo DNA (Valko et al., 2006).

Hydroperoxylový radikál je protonovanou formou superoxidového radikálu. $\cdot\text{OOH}$ na základě toho, že je hydrofobní, může procházet biologickými membránami, ve kterých reaguje s membránovými lipidy a způsobuje jejich oxidační poškození (Piterková et al., 2005).

Všechny výše zmíněné ROS vznikají v živočišných buňkách buď enzymovými nebo neenzymovými dráhami (Tab. 1) (Bayir, 2005).

Tabulka 1: Neenzymové a enzymové zdroje reaktivních forem kyslíku.

Zdroje	Reaktivní formy kyslíku
Enzymové zdroje:	
Respirační řetězec – komplex I, II, III	$\cdot\text{O}_2^-$
Xanthinoxidasa	$\cdot\text{O}_2^-$, H_2O_2
NADPHoxidasa	$\cdot\text{O}_2^-$
Cytochromy P450	$\cdot\text{O}_2^-$, H_2O_2
Neenzymové zdroje:	
Fentonova reakce	$\cdot\text{OH}$
Světelné záření	O_2^1 , $\cdot\text{O}_2^-$
Katecholaminy	$\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{OOH}$

2.2.1 Enzymové zdroje ROS

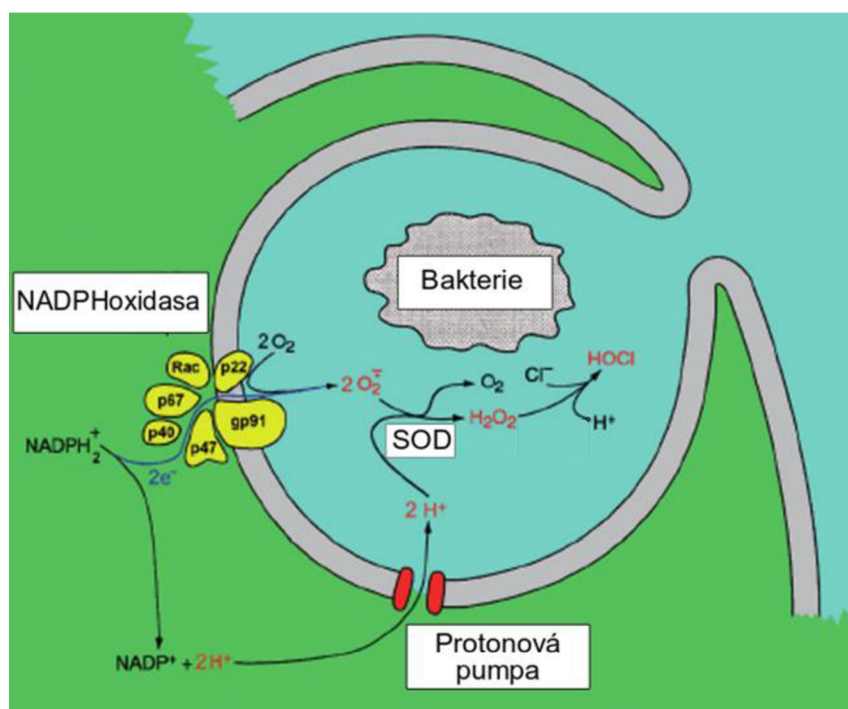
U živých organismů žijících aerobním způsobem života se většina přijatého kyslíku buňkou (okolo 98 %) redukuje přímo na vodu v elektronovém transportním řetězci (ETC), který je umístěný ve vnitřní mitochondriální membráně mitochondrií. Zbývá 2 % kyslíku jsou redukována v ETC postupně přijetím jednoho elektronu, což má za následek tvorbu superoxidového radikálu (Obr. 2) (Valko et al., 2006; Hamanaka & Chandel, 2009). Zdrojem superoxidových anion radikálů v ETC jsou komplex I (NADH-ubichinonoxidoreduktasa, EC 1.6.5.3), komplex II (sukcinát-ubichinonoxidoreduktasa, EC 1.3.5.1) a komplex III (ubichinol-cytochrom c oxidoreduktasa, EC 1.10.2.2) (Hamanaka & Chandel, 2009). $\cdot\text{O}_2^-$ vzniklé jednoelektronovou redukcí O_2 jsou dismutovány v matrix mitochondrií na H_2O_2 za katalýzy superoxidodismutasy (SOD, EC 1.15.1.1) (Abreu & Cabelli, 2010).

Zdrojem ROS je také xanthinoxidasa, jedná se o enzym katalyzující hydroxylaci purinů, primárně podílející se na přeměně hypoxanthinu na xanthin a následně xanthinu na kyselinu močovou. Při daných reakcích dochází k redukcí molekulárního kyslíku za vzniku $\cdot\text{O}_2^-$ a následně H_2O_2 (Valko et al., 2006).

Dalším enzymovým zdrojem ROS jsou enzymy rodiny cytochromů P450 (CYP, EC 1.14.14.1). Ty se vyskytují v mitochondriích a v membráně endoplazmatického retikula (mikrosomální CYP) (Rewitz et al., 2006). Funkce CYP je degradace xenobiotik, tedy látek pro organismus cizích. Při degradačním procesu často dochází k úniku elektronů

z NADPH, které slouží jako donor elektronů pro CYP, a ty následně reagují s kyslíkem za vzniku $\cdot\text{O}_2^-$ a H_2O_2 (Zangar et al., 2004; Lushchak, 2014).

Při napadení organismu patogenem dochází k imunitní reakci, která je doprovázena tzv. oxidačním vzplanutím, tedy náhlým nárůstem hladin ROS prostřednictvím NADPHoxidasy (Obr. 3). Specializovaná imunitní buňka fagocytuje mikrobiální patogen (např. bakterii). V buněčné membráně této specializované imunitní buňky se nachází enzym NADPHoxidasa, který se podílí na redukci molekulárního kyslíku za vzniku $\cdot\text{O}_2^-$. Donorem elektronů pro tuto reakci je koenzym NADPH. Superoxidové radikály jsou následně redukovány na peroxid vodíku, spontánně nebo především za katalýzy SOD. Vzniklé ROS jsou pro patogen toxické a vedou k jeho usmrcení (DeCoursey & Ligeti, 2005).



Obrázek 3: Specializovaná imunitní buňka fagocytuje patogenní mikroorganismus. NADPHoxidasa přítomná v membráně imunitní buňky katalyzuje produkci $\cdot\text{O}_2^-$, které jsou následně dismutovány za katalýzy SOD na H_2O_2 . ROS jsou pro patogenní organismus toxické a dochází k jeho usmrcení. Převzato z: (DeCoursey & Ligeti, 2005). Upraveno v Inkscape.

2.2.2 Neenzymové zdroje ROS

Mezi neenzymové cesty vzniku ROS v buňce patří působení ionizujícího záření, znečištěné prostředí nebo tvorba ROS zprostředkovaná přechodnými kovy (Valko et al.,

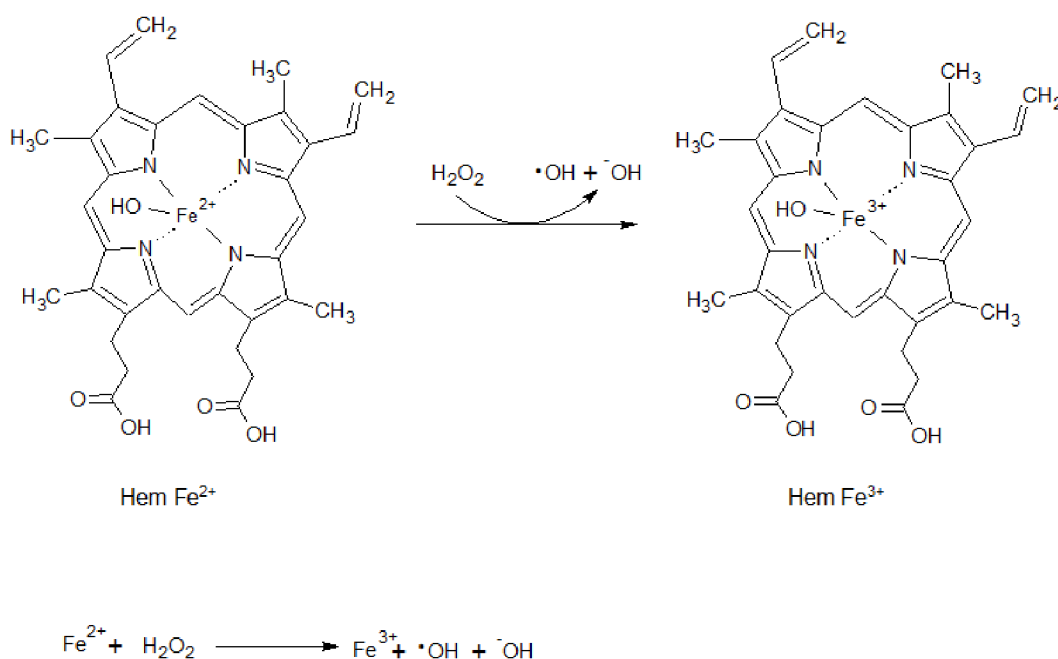
2006). Do neenzymových zdrojů se řadí i autooxidace katecholaminů (Cohen, 1994). Během autooxidace katecholaminů, jako je například dopamin, dochází za přítomnosti přechodných kovů k tvorbě reaktivních forem kyslíku (Miller et al., 1996).

Zdrojem reaktivnějších forem ROS je také molekulární kyslík. Pokud v buňkách O_2 absorbuje ionizující záření, dochází k tvorbě singletového kyslíku a superoxidového radikálu (Schlothauer, 2013).

2.2.2.1 Tvorba ROS zprostředkovaná kovy

Reaktivní formy kyslíku se v buňkách tvoří i v přítomnosti přechodných kovů, jako jsou například železo, chrom a vanad. O_2 , $\cdot O_2^-$ nebo H_2O_2 reagují s přechodnými kovy, které přecházejí do oxidovaného/redukovaného stavu a současně se generují další formy ROS.

Superoxidové anion radikály jsou schopny v molekulách obsahujících železo v oxidačním stavu tři (Fe^{3+}) redukovat toto železo na Fe^{2+} , jedná se o tzv. Haberovu-Weissovu reakci. Toto Fe^{2+} se následně uplatňuje ve Fentonově reakci, během které reaguje s H_2O_2 za vzniku velmi reaktivního hydroxylového radikálu a hydroxylového aniontu. Souběžně dochází k oxidaci železa zpět na Fe^{3+} (Obr. 4) (Piterková et al., 2005).



Obrázek 4: Fentonova reakce zobrazena na struktuře skupiny hem a vyjádřena chemickou rovnicí. H_2O_2 reaguje s Fe^{2+} za tvorby $\cdot OH$ a $\cdot OH$ a oxidace železa na Fe^{3+} . Převzato z: (Kord Forooshani et al., 2020), vytvořeno v ChemSketch.

Chrom v oxidačním stavu šest (Cr^{6+}) je pro organismus neškodný. Pokud je ale Cr^{6+} redukován na Cr^{5+} může docházet k poškození DNA. Dále obdobně jako u iontů železa $\cdot\text{O}_2^-$ redukuje Cr^{6+} na Cr^{5+} , a ten pak po reakci s H_2O_2 tvoří hydroxylový radikál v tzv. Fenton-like reakci (Valko et al., 2006; Bokare & Choi, 2014).

Vanad v oxidačním stavu pět (V^{5+}) je v buňce redukován na V^{4+} kyselinou askorbovou. V^{4+} po reakci s O_2 tvoří $\cdot\text{O}_2^-$. Některé $\cdot\text{O}_2^-$ jsou dismutovány na H_2O_2 za katalýzy SOD. H_2O_2 dále může reagovat s V^{4+} a oxidovat ho na V^{5+} za vzniku $\cdot\text{OH}$. Hydroxylové radikály se pak podílejí na buněčném oxidačním poškození (Crans et al., 2004).

2.2.3 Produkce ROS u včely medonosné

U včely medonosné ROS vznikají podobně jako u dalších organismů v rámci bazálního metabolismu. Tyto fyziologické hladiny ROS se podílí na buněčné signalizaci a jsou pro včelu prospěšné. Spolu se zvyšujícím se věkem včely ale hladina ROS začíná stoupat a při současném působení stresových faktorů, které mají za následek vysokou produkci ROS, může docházet k oxidačnímu stresu. U včelích dělnic vznikají ROS také při aktivním letovém stylu života, kdy dělnice létavky opouštějí úl za účelem sbírání pylu a nektaru. Denně může takto včela letem strávit až několik hodin, častokrát na dlouhé vzdálenosti. Aby tohoto vytížení byla včela schopna, musí se zvýšit rychlost metabolismu a okysličování, to má za následek produkci ROS včetně $\cdot\text{O}_2^-$, $\cdot\text{OH}$, H_2O_2 (Margotta et al., 2018).

Hlavním zdrojem ROS u včely medonosné je působení stresových faktorů. Stresové faktory se dělí na abiotické a biotické. Mezi abiotické se řadí extrémní teploty a působení pesticidů. Biotickými stresovými faktory jsou patogenní mikroorganismy nebo roztoči (Janků et al., 2019). Při nadměrné tvorbě ROS dochází k jejich hromadění v buňkách a následně dochází k oxidačnímu poškození biomolekul. Včela medonosná má otevřenou oběhovou soustavu, což usnadňuje prostupnost ROS k důležitým místům jako je mozek a letové svalstvo (Nikolenko et al., 2012).

Při napadení včelího organismu patogeny (viry, bakterie či houbové patogeny) dochází k oxidačnímu vzplanutí, při kterém se produkují ROS, jako je $\cdot\text{O}_2^-$, který toxicky působí na patogen i jeho okolí a dochází k usmrcení patogenu (Chaitanya et al., 2016).

Důležitý vliv na vznik oxidačního stresu může mít potrava. Pokud jsou zemědělské plodiny, které včely opylují, ošetřeny pesticidy, tak pozřením této potravy dochází při

degradaci těchto xenobiotik ve včelím organismu k tvorbě ROS (Berenbaum & Johnson, 2015). Již subletální dávky pesticidů přijímané potravou mají vliv na mobilitu včel a mohou způsobovat komunikační poruchy (Medrzycki et al., 2003). Stravu podávanou včelařem lze obohatit o některé neenzymové antioxidanty jako například vitamínem C nebo vitamínem E, pro zvýšení hladiny antioxidantů (Farjan et al., 2012; Janků et al., 2019).

2.3 ANTIOXIDAČNÍ SYSTÉM

Živé organismy se před negativním účinkem ROS chrání prostřednictvím antioxidačního systému, který se podílí na odbourávání ROS v buňce na nereaktivní a organismu neškodné molekuly jako je kyslík a voda. Dále také antioxidační systém napomáhá k obnově poškozených biomolekul (Valko et al., 2006).

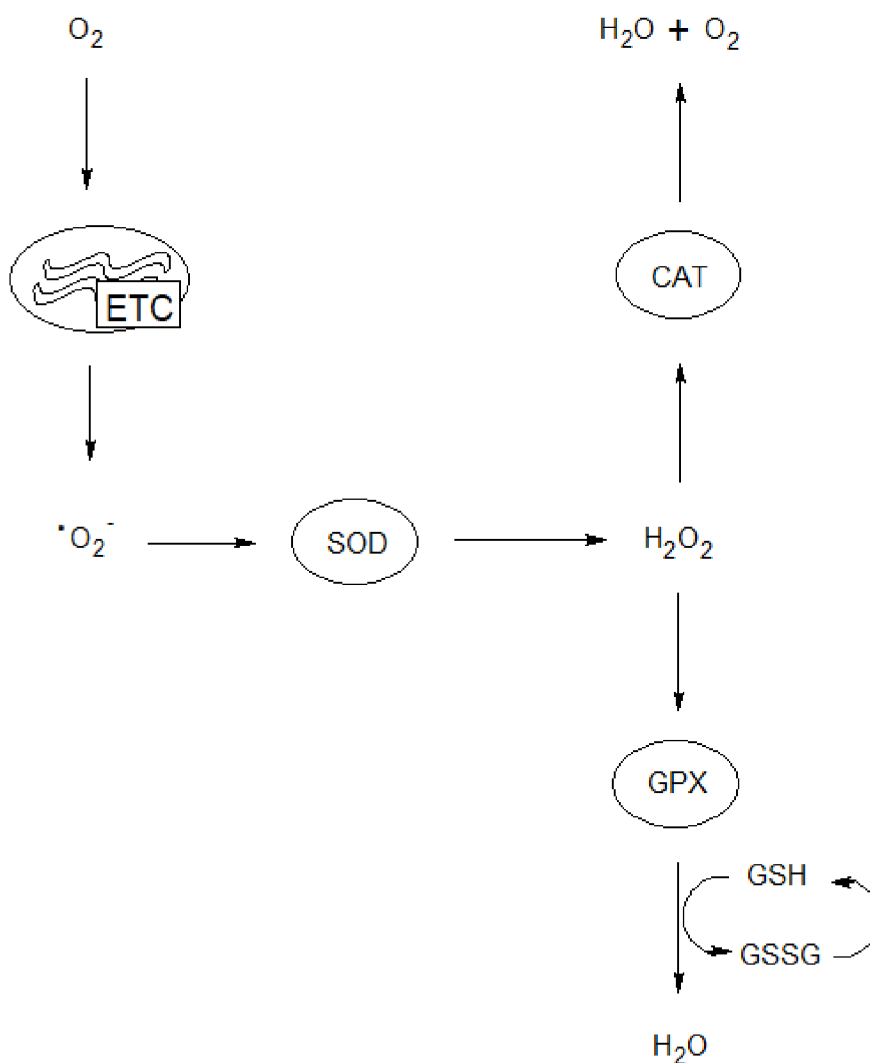
Složkou antioxidačního systému jsou antioxidanty, což jsou látky, které mají schopnost degradovat oxidačně reaktivní molekuly, čímž napomáhají předcházet vzniku oxidačního poškození (Halliwell & Gutteridge, 2015). Antioxidanty se dělí na primární a sekundární. Primární antioxidanty reagují přímo s ROS nebo s reaktivními produkty oxidačního poškození a redukuje je na nereaktivní molekuly. Sekundární antioxidanty působí v antioxidační ochraně nepřímou tím, že se podílejí na opravě poškozených biomolekul. Dále lze antioxidanty rozdělit na enzymové a neenzymové (Nikolenko et al., 2012).

Pokud dochází ke zvýšené produkci ROS, může daný organismus na tento stav reagovat zvýšením genové exprese antioxidačních enzymů, díky čemuž se zvyšuje jejich hladina. Jednotlivé antioxidanty se liší místem účinku a reaktivním oxidantem, se kterým reagují (ROS, reaktivní aldehydy, lipoperoxidy atd.) (Sies et al., 2005).

2.3.1 Antioxidační enzymy

Antioxidační enzymy řadíme mezi primární i sekundární antioxidanty. Nejvýznamnějšími primárními enzymovými antioxidanty jsou superoxiddismutasy, katalasy (CAT, EC 1.11.1.6) a peroxidasy (PX, EC 1.11.1) (Obr. 5). Mezi sekundární enzymové antioxidanty patří některé reduktasy (EC 1.6.4), které regenerují neenzymové antioxidanty, které slouží jako donor elektronu pro antioxidační enzymy. Například pro některé typy peroxidasy jsou

to glutathion (GSH) či thioredoxin (Trx). K redukci neenzymových antioxidantů využívají reduktasy jako donor elektronu například nikotinamidadeninukleotid(fosfát) (NAD(P)H) (Birben et al., 2012; Konupková, 2020).



Obrázek 5: Přehled reakcí nejvýznamnějších antioxidantních enzymů. Superoxidový radikál (produkovaný např. elektronovým transportním řetězcem (ETC)) je dismutován superoxidodismutasou (SOD) na peroxid vodíku, který může být rozložen katalasou (CAT) na vodu a kyslík nebo peroxidasou (v tomto případě glutathionperoxidasou (GPX) na vodu). Pro peroxidasu musí být přítomen donor e^- (pro GPX je to glutathion). Převzato z: (Nandi et al., 2019), vytvořeno v ChemSketch.

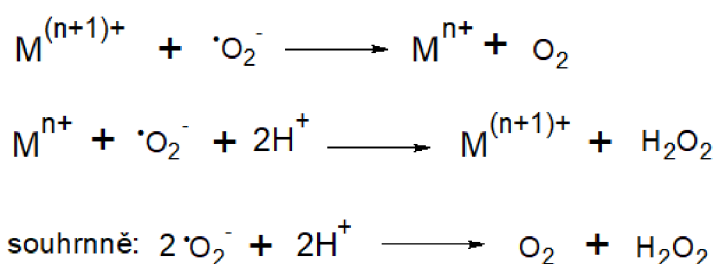
2.3.1.1 Antioxidační enzymy u včely medonosné

U včely medonosné bylo prokázáno 39 genů pro expresi antioxidantních enzymů (Nikolenko et al., 2012). Nejvýznamnější antioxidantními enzymy u včel jsou

superoxiddismutasy, katalasy, thioredoxinperoxidasy (TPX, EC 1.11.1.24) a glutathion-S-transferasy (GST, EC 2.5.1.18). Včelí genom postrádá geny kódující glutathion-reduktasu (GR, EC 1.6.4.2), která redukuje oxidovaný glutathion vznikající z redukovaného glutathionu při reakci s ROS za katalýzy příslušného enzymu. Funkce GR je nahrazena thioredoxin-reduktasou (TR, EC 1.6.4.5) a thioredoxinem (Nikolenko et al., 2012; Chaitanya et al., 2016). Dále včelí genom postrádá geny kódující glutathionperoxidasu (GPX, EC 1.11.1.9), ale obsahuje dva homologní geny kódující dva enzymy příbuzné GPX. Jeden enzym je označován jako Gtpx-2 (EC 1.11.1.9) a jedná se o homolog GPX s thioredoxinperoxidasovou aktivitou, jelikož spíše než GSH využívá jako donor e⁻ Trx. Druhý enzym detailní biochemickou charakterizací dosud postrádá. Funkce GPX u včel je nahrazena enzymy TPX a GST, které mají peroxidasovou aktivitu (Corona & Robinson, 2006; Farjan et al., 2012).

2.3.1.2 Superoxiddismutasa

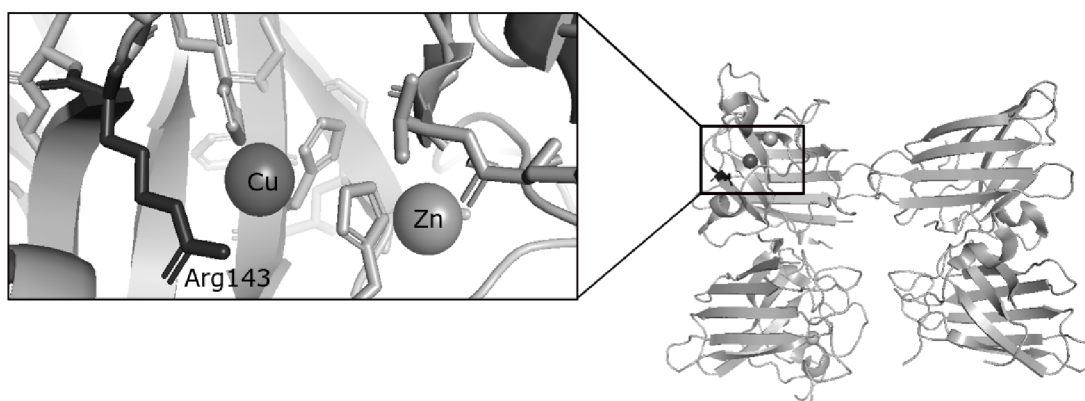
Superoxiddismutasa je enzym, který katalyzuje dismutaci superoxidového anion radikálu na kyslík a peroxid vodíku (Obr. 6). SOD se v buňce vyskytuje v několika isoformách. Ty se liší aminokyselinovým složením, centrálním atomem kovu, počtem podjednotek a výskytem v organismu (Valko et al., 2006). Jsou známy čtyři isoformy SOD, a to SOD obsahující jako kofaktor atom manganu (Mn-SOD), atom mědi a zinku (Cu, Zn-SOD), atom železa (Fe-SOD) a atom niklu (Ni-SOD).



Obrázek 6: Reakce dismutace superoxidového anion radikálu za katalýzy superoxid-dismutasy, pro isoformy Cu, Zn-SOD a Mn-SOD: pro M=Cu (n=1), M=Mn (n=2), převzato z: (Abreu a Cabelli, 2010), vytvořeno pomocí ChemSketch.

V rámci enzymové katalýzy se reakce katalyzovaná SOD odehrává kinetickým mechanismem, který se nazývá ping-pongový. V reakci katalyzované SOD, dochází nejprve k redukci kofaktorové složky enzymu a jeho následné reoxidaci, a to se

souběžnou oxidací a redukcí superoxidových radikálů (Abreu & Cabelli, 2010). Např. v případě Cu, Zn-SOD enzymová katalýza probíhá následovně: aminokyseliny v blízkosti aktivního místa enzymu (Obr. 7) směřují $\cdot\text{O}_2^-$ k atomu mědi v oxidačním stavu dva (Cu^{2+}). Po vazbě $\cdot\text{O}_2^-$ na Cu^{2+} dochází k redukcí na Cu^+ za vzniku O_2 . Dále se k Cu^+ přivádí protony vodíku (produkované v dýchacím řetězci) a druhá molekula $\cdot\text{O}_2^-$ a vzniká hydroperoxylový radikál ($\cdot\text{OOH}$) a následně H_2O_2 . Souběžně je Cu^+ oxidována do původního stavu Cu^{2+} (Nedd et al., 2014).



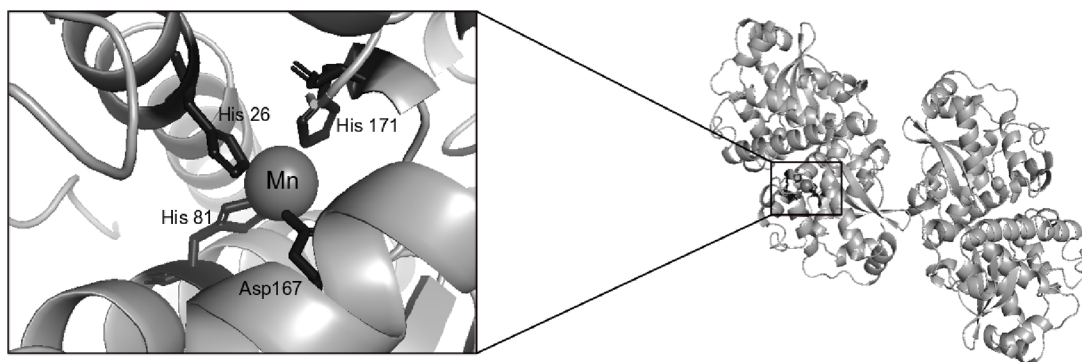
Obrázek 7: Kvartérní struktura Cu, Zn-SOD se zaměřením na aktivní místo enzymu obsahující atomy kovu, vytvořeno pomocí PyMOL a Inkscape dle databáze Protein Data Bank (PDB).

V prokaryotické buňce se vyskytují všechny čtyři typy SOD. V eukaryotické buňce, včetně rostlinných organismů, se nachází Cu, Zn-SOD v chloroplastech, v extracelulárním prostoru a v cytoplasmě, Mn-SOD se nachází v mitochondriích a peroxisomech a Fe-SOD v chloroplastech a cytoplasmě rostlinné buňky (Abreu & Cabelli, 2010; Freitinger Skalická et al., 2012). Fe-SOD a Ni-SOD se u hmyzu nevyskytují (Abreu & Cabelli, 2010).

Cu, Zn-SOD je metaloprotein o molekulové hmotnosti 32 kDa. Je to dimer, který se skládá ze dvou monomerních podjednotek, z nichž každá má jeden disulfidový můstek a váže měďnatý a zinečnatý atom (Obr. 7). Měď slouží jako kofaktor a zinek má strukturní funkci (Butler et al., 2021).

Mn-SOD se nachází v prokaryotických bakteriálních buňkách jako dimer, v eukaryotických buňkách se vyskytuje ve formě tetrameru o molekulové hmotnosti přibližně 96 kDa. Každá podjednotka obsahuje jeden atom manganu, který se váže na aminokyseliny histidin a kyselinu asparagovou (Obr. 8). Nachází se v matrix

mitochondrií, kde vycytává $\cdot\text{O}_2^-$ z elektronového transportního řetězce. Při katalýze dismutace $\cdot\text{O}_2^-$ přechází mangan cyklicky mezi oxidačním stavem Mn^{3+} a Mn^{2+} (Abreu & Cabelli, 2010).



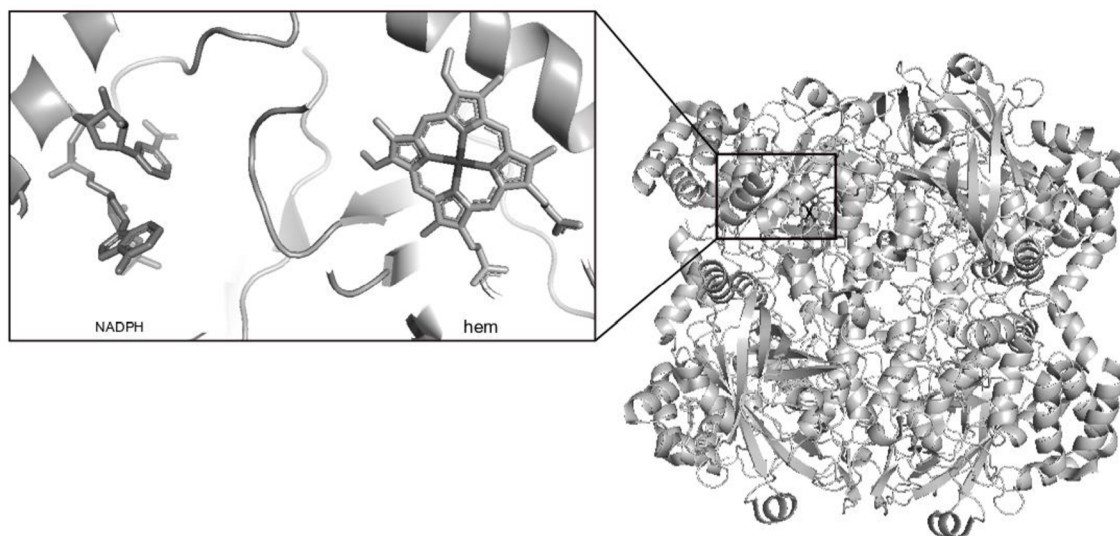
Obrázek 8: Kvartérní struktura Mn-SOD se zaměřením na aktivní místo enzymu obsahující atom kovu, vytvořeno pomocí PyMOL a Inkscape dle databáze PDB.

U včely medonosné je exprimována mitochondriální Mn-SOD, cytoplasmatická Cu, Zn-SOD a extracelulární Cu, Zn-SOD (Corona & Robinson, 2006).

2.3.1.3 Katalasa

Katalasa je antioxidační enzym, který se v eukaryotické buňce vyskytuje převážně v peroxisomech, dále je také zastoupena v cytoplasmě a v mitochondriích (Nandi et al., 2019). Tento enzym katalyzuje rozklad dvou molekul H_2O_2 na molekulu O_2 a dvě molekuly H_2O .

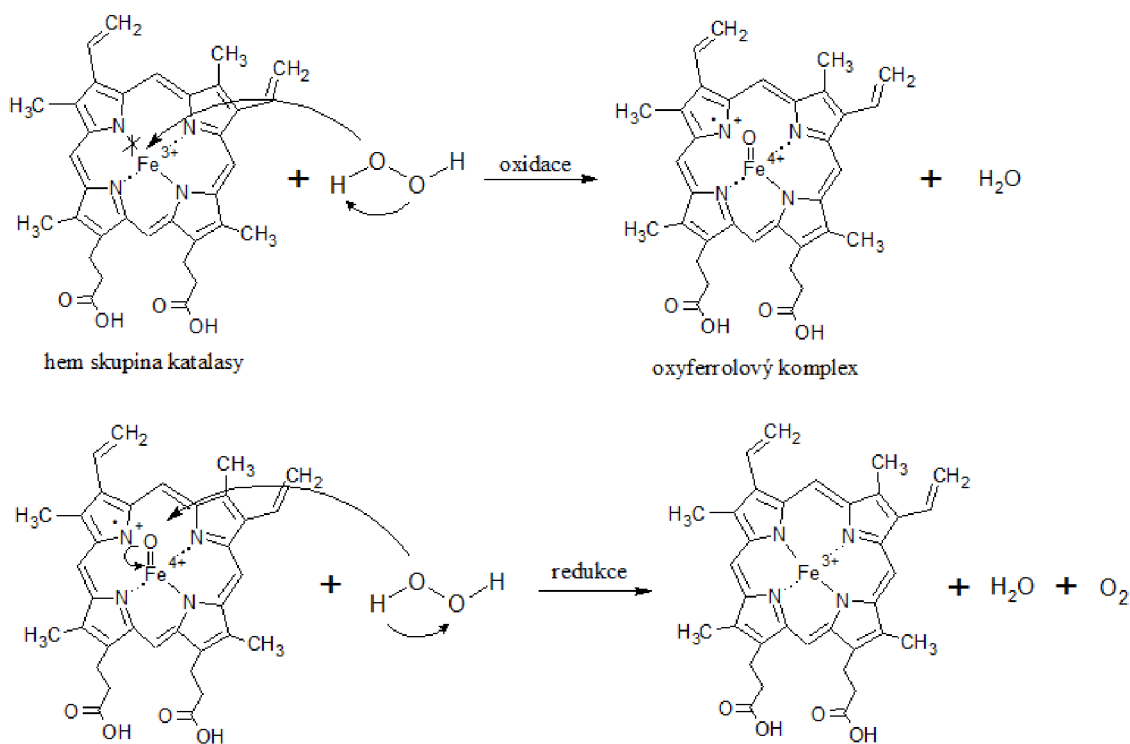
Existují tři rodiny CAT, a to monofunkční katalasa (CAT, EC 1.11.1.6) obsahující skupinu hem (Obr. 9), bifunkční katalasa-peroxidasa (KatG, EC 1.11.1.21) obsahující skupinu hem a katalasa, která místo skupiny hem obsahuje mangan (Mn-CAT) (Nandi et al., 2019). KatG se v eukaryotických buňkách vyskytuje pouze u hub a řas. Mn-CAT je přítomna pouze u bakterií. Monofunkční katalasa se vyskytuje u eukaryot a je z rodiny CAT nejrozšířenější (Zamocky et al., 2008).



Obrázek 9: Kvartérní struktura katalasy se zaměřením na aktivní místo enzymu obsahující skupinu hem a NADPH, vytvořeno pomocí PyMOL a Inkscape dle databáze PDB.

V aktivním místě monofunkční katalasy je skupina hem, která je prostetickou skupinou tohoto enzymu, tedy kovalentně vázaný kofaktor. Skupina hem sestává z porfyrinového kruhu, který obsahuje čtyři pyrroly s navázanými substituenty, a se středem z atomu železa v oxidačním stavu tři (Fe^{3+}). V blízkosti hemu se nachází NADPH, který napomáhá při regeneraci enzymu po reakci s H_2O_2 do původního stavu (Zamocky et al., 2008).

Mechanismus rozkladu H_2O_2 katalyzovaný monofunkční katalasou se dělí do dvou kroků (Obr. 10). V prvním z nich jedna molekula H_2O_2 oxiduje Fe^{3+} v hemu na Fe^{4+} , oddělí se jeden pyrrol, naváže se kyslík dvojnou vazbou za vzniku oxyferrylového komplexu a molekuly H_2O . V dalším kroku druhá molekula H_2O_2 redukuje za pomoci NADPH železo v hemu do původního stavu a dochází ke vzniku molekuly O_2 a druhé molekuly H_2O (Chelikani et al., 2004).



Obrázek 10: Mechanismus reakce rozkladu peroxidu vodíku katalyzované katalasou. Skupina hem je oxidována na oxyferrylový komplex a poté redukována zpět do původního stavu. Převzato z: (Chelikani et al., 2004), vytvořeno pomocí ChemSketch.

H₂O₂ vystupuje v rámci katalasových reakcí jako oxidační i redukční činidlo. Katalasy jsou schopny štěpit vazbu kyslík-kyslík peroxoskupiny i v nízkomolekulárních peroxidech jako jsou ethylhydroperoxid a acetylhydroperoxid. Tato vazba kyslík-kyslík se štěpí heterolyticky, přičemž je jeden kyslík redukován na vodu a druhý kyslík se váže na hem (Zamocky et al., 2008).

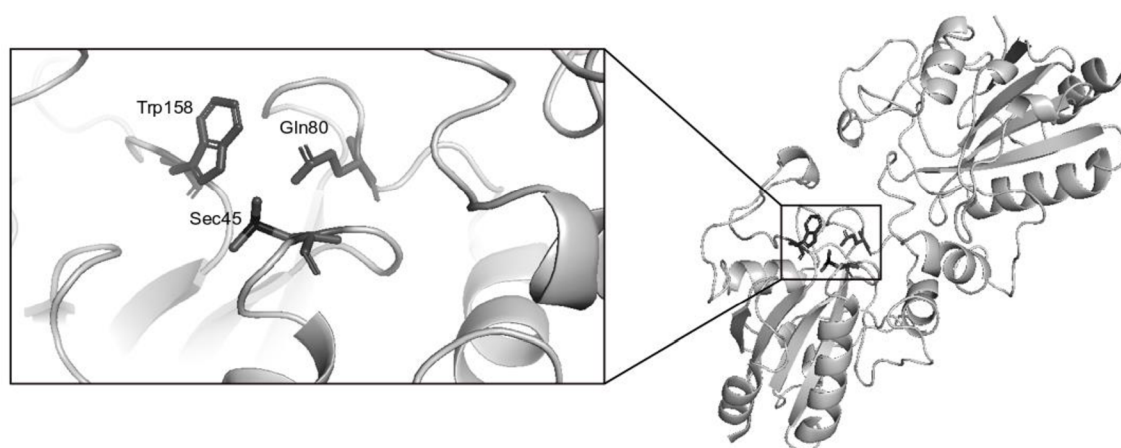
U včely medonosné se katalasa vyskytuje v cytoplasmě buněk (Corona & Robinson, 2006). U dělnic je její hladina nejvyšší v trávicí soustavě, dále v letových svalech. Aktivita katalasy u včelích dělnic se snižuje spolu s rostoucím věkem, což má za následek rozvoj oxidačního stresu (Corona & Robinson, 2006; Williams et al., 2008). U trubců je vysoká aktivita katalasy ve spermatu, což může mít pozitivní vliv na životaschopnost spermií uchovávaných v semenném vaku včelí matky (Weirich et al., 2002).

2.3.1.4 Peroxidasy

Peroxidasy katalyzují rozklad peroxidu vodíku za přítomnosti široké škály donorů elektronu. Sloučeniny sloužící jako donory e⁻ jsou například glutathion, askorbát či thioredoxin, které jsou zároveň neenzymovými antioxidanty (Rand et al., 2015). Některé

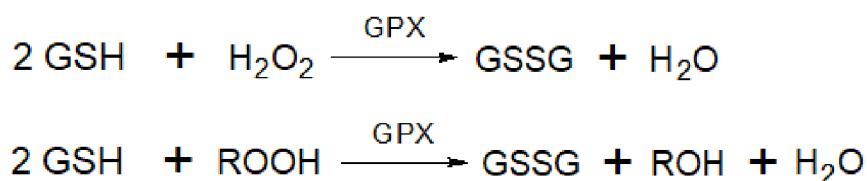
peroxidasy katalyzují, mimo rozkladu peroxidu vodíku, také rozklad dalších ROS a lipoperoxidů, a tím chrání organismus před oxidačním poškozením biomolekul (Panday et al., 2020). Obecně se mezi nejvýznamnější peroxidasy u živých organismů řadí glutathionperoxidasa, peroxiredoxin (Prx, EC 1.11.1.15), thioredoxinperoxidasa nebo askorbátperoxidasa (APX, EC 1.11.1.1).

Glutathionperoxidasa je antioxidační enzym, který má ve svém aktivním centru aminokyselinu selenocystein (Obr. 11) (Espinosa-Diez et al., 2015).



Obrázek 11: Kvartérní struktura glutathionperoxidasy se zaměřením na aktivní místo enzymu, vytvořeno pomocí PyMOL a Inkscape.

GPX katalyzuje redukci peroxidu vodíku nebo hydroperoxyfosfolipidů na vodu anebo alkohol za využití GSH jako zdroje elektronů. Dvě molekuly GSH přechází na oxidovanou formu glutathionu (GSSG), za vzniku vody či alkoholu odpovídajícímu fosfolipidovému zbytku (Obr. 12) (Valko et al., 2006; Espinosa-Diez et al., 2015). Oxidovaný GSSG je transportován transportéry do extracelulárního prostoru, kde je redukován na GSH působením glutathionreduktasy a přítomnosti NADPH jako donoru e^- (Panday et al., 2020).



Obrázek 12: Reakce redukováného glutathionu (GSH) s peroxidem vodíku (H_2O_2) nebo s lipidovým peroxidem (ROOH) za katalýzy glutathionperoxidasy, převzato z: (Valko et al., 2006), vytvořeno v ChemSketch.

Genom včely medonosné neobsahuje geny kódující GPX, ale obsahuje dva homologní geny kódující dva enzymy příbuzné GPX. Jedná se o enzym Gtpx-2, který má thioredoxinperoxidaseovou aktivitu. Druhý enzym detailní biochemickou charakterizaci postrádá (Corona & Robinson, 2006). Dále také včelí organismus postrádá geny pro GR. Její funkce redukce oxidovaného glutathionu je nahrazena thioredoxinreduktasou a thioredoxinem (Chaitanya *et al.*, 2016). Pokud je včela vystavena působení xenobiotik (pesticidy, insekticidy) vyskytujících se v potravě, zvyšuje se exprese Gtpx-2 (Rand *et al.*, 2015).

Peroxiredoxiny jsou skupinou enzymů s peroxidaseovou aktivitou. Peroxiredoxiny katalyzují redukci peroxidu vodíku nebo organických peroxidů na vodu, respektive příslušné alkoholy. V aktivním místě peroxiredoxinu je cystein, jehož thiolová skupina slouží jako donor elektronu pro redukci H_2O_2 a organických peroxidů. Zpět do redukované formy přechází oxidovaný peroxiredoxin reakcí s thioredoxiny. (Espinosa-Diez *et al.*, 2015; Panday *et al.*, 2020).

Redoxní systém GPX ve spolupráci s peroxiredoxiny odstraní až 80 % H_2O_2 tvořícího se uvnitř buňky (Panday *et al.*, 2020).

Askorbátperoxidasa je enzym ze třídy peroxidas. Jako donor elektronů využívá APX kyselinu askorbovou, jiným názvem vitamin C (Shigeoka, 2002). APX katalyzuje redukci peroxidu vodíku za současné oxidace kyseliny askorbové. CAT je hlavním enzymem redukujícím H_2O_2 , ale jelikož má vysokou K_m , není schopna zredukovat všechny nadbytečně produkovaný H_2O_2 , proto jsou zbylé nižší koncentrace H_2O_2 redukovány pomocí askorbátperoxidaseové aktivity (Korayem *et al.*, 2012). U včely medonosné se tato aktivita zvyšuje při vysokých hladinách H_2O_2 ve včelím organismu, a to například při konzumaci potravy obsahující oxidační látky, kdy pro redukci H_2O_2 nedostačuje CAT (Korayem *et al.*, 2012).

2.3.1.5 Glutathion-S-transferasa

Glutathion-S-transferasy jsou enzymy katalyzující reakci GSH s látkou exogenního původu za vzniku komplexu, který je poté přenesen přes membránový přenašeč ven z buňky (Nebert & Vasiliou, 2004). U hmyzu, respektive u včel, je GST zodpovědná za degradaci xenobiotik, jako jsou například pesticidy (Nikolenko *et al.*, 2012).

U hmyzu se GST dělí do dvou rodin, a to cytosolické a mikrosomální. Mikrosomální rodina GST jsou proteiny vázané na buněčné membrány a jsou složeny ze tří podjednotek.

Oproti cytosolické rodině glutathion-S-transferas (cGST) jsou kódovány pouze 1-2 geny, ale funkcí jsou podobné cGST (Enayati et al., 2005). cGST jsou homodimery či heterodimery o velikosti okolo 25 kDa, které obsahují specifickou doménu vázající GSH tzv. G-místo (Enayati et al., 2005). cGST se u hmyzu dělí do šesti tříd: Epsilon (ϵ -GST), Delta (δ -GST), Theta (θ -GST), Zeta (ζ -GST), Omega (ω -GST) a Sigma (σ -GST) (Friedman, 2011).

V genomu včely medonosné se vyskytuje 10 genů kódujících cGST, to odpovídá zhruba polovičnímu počtu genů než u jiného hmyzu (např. 38 genů u *Drosophila melanogaster*). To může mít za následek větší náchylnost včel ke xenobiotikům (Nikolić et al., 2019).

U včelích dělnic byla detekována mnohem vyšší aktivita GST oproti aktivitě SOD a CAT jak v letní generaci, tak v zimní generaci včel (Orčić et al., 2017). To je způsobeno nejspíše potřebou ve střevě degradovat pesticidy a jiná xenobiotika přijímané potravou (Weirich et al., 2002).

2.3.1.6 Zapojení antioxidačních systémů do fyziologických pochodů u včely medonosné

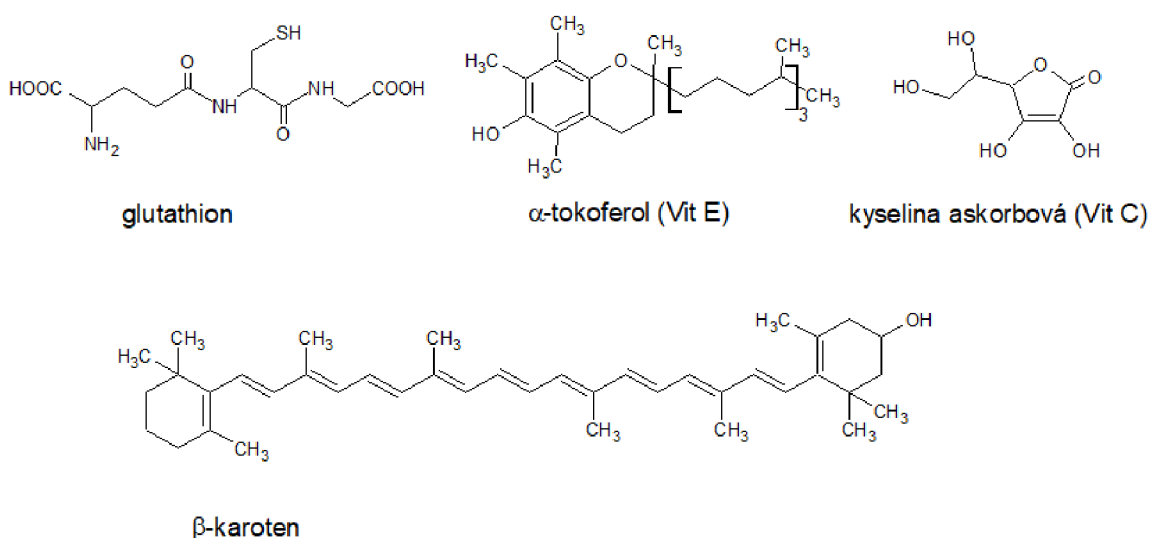
Během prvních tří dnů vývoje včelího embrya dochází kvůli ochraně před oxidačním poškozením ke zvýšení exprese glutathion-S-transferasy a thioredoxinperoxidasy na základě zvýšeného přísunu kyslíku potřebného pro vývoj embrya (Nikolenko et al., 2012). Díky vysoké koncentraci katalasy, superoxiddismutasy a glutathion-S-transferasy v semenném váčku včelí matky je zajištěna ochrana a životaschopnost uložených spermií (Nikolenko et al., 2012). Aktivita katalasy je zvýšena ve střevě oplodněné matky, kde eliminuje ROS z potravy (Nikolenko et al., 2012). U létavek oproti mladým dělnicím pracujícím v úlu byla zaznamenána zvýšená exprese antioxidačních enzymů v hlavě (Mn-SOD, CAT, Cu, Zn-SOD), v hrudi (CAT, Mn-SOD) i v zadečku (CAT, Mn-SOD) (Cervoni et al., 2017).

U zimní generace včel byla pozorována zvýšená exprese katalasy ve střevě jako ochrana před tvořícím se H_2O_2 při trávení bez letového režimu (Orčić et al., 2017). Zatím co superoxiddismutasa a glutathion-S-transferasa měly sníženou expresi oproti letní generaci včel, a to nejspíše z důvodu neaktivního života v období zimy (Orčić et al., 2017).

2.3.2 Neenzymové antioxidanty

Neenzymové antioxidanty (Obr. 13) jsou převážně nízkomolekulární sloučeniny, které se liší výskytem v buňce. Mají více funkcí, například regenerace oxidovaných antioxidantů, dále mohou být kofaktory enzymů či regulátory genové exprese proteinů. Do skupiny neenzymových antioxidantů u včely medonosné se řadí zejména glutathion, vitamin C, vitamin E, karotenoidy a vitellogenin (Chaitanya et al., 2016; Konupková, 2020; Tawfik et al., 2020). Můžeme je dělit na základě jejich rozpustnosti. A to na antioxidanty rozpustné ve vodě (glutathion, vitamin C) a antioxidanty rozpustné v tucích (vitamin E, karotenoidy). Antioxidanty rozpustné v tucích se nejčastěji vyskytují v biologických membránách. Vlastností ve vodě rozpustných antioxidantů je procházení do buněk a organel přes membrány a jejich působení v místě potřeby (Felton & Summers, 1995).

Antioxidační schopnost neenzymových antioxidantů spočívá v redukci prooxidačních molekul darováním elektronu, poté antioxidant přechází do své oxidované formy (Espinosa-Diez et al., 2015).



Obrázek 13: Strukturální vzorce vybraných neenzymových antioxidantů, vytvořeno v ChemSketch.

2.3.2.1 Glutathion

Glutathion je peptid skládající se ze tří aminokyselin – glycinu, cysteinu a glutamové kyseliny. Biosyntéza GSH probíhá ve dvou krocích, oba z nich jsou závislé na přítomnosti ATP. První krok syntézy GSH je katalyzován glutamát-cysteinligasou (GCL, EC 6.3.2.2),

kdy reakcí cysteinu a glutamátu vzniká γ -glutamylcystein. Druhý krok syntézy sestává z reakce γ -glutamylcysteinu a glycinu, která je katalyzována glutathionsynthetasou (GS, EC 6.3.2.3) (Espinosa-Diez et al., 2015).

GSH v rámci antioxidační ochrany vystupuje jako redukční činidlo, například jako donor e^- pro reakci s GPX, při níž dochází k detoxifikaci H_2O_2 . Po předání elektronu H_2O_2 se molekula GSH oxiduje a reakcí s další molekulou oxidovaného GSH dochází ke vzniku disulfidové vazby. Oxidovaný glutathion, tedy GSSG, je regenerován zpět na GSH glutathionreduktasou, kdy donory elektronů pro reakci jsou FAD a NADPH (Panday et al., 2020). Podobně jako H_2O_2 je GSH schopen redukovat lipidové peroxidy za tvorby odpovídajícího alkoholu (Valko et al., 2006).

GSH se také podílí na odstraňování produktů peroxidace lipidů, a to 4-hydroxynonenalu (4-HNE) tak, že vzájemně vytvoří komplex, který je exportován do extracelulárního prostoru. Tento proces probíhá za katalýzy glutathion-S-transferasy (Tjalkens et al., 1999). Eliminace 4-HNE zabraňuje hromadění tohoto produktu v buňce, které by mělo za následek další oxidační poškození biomolekul, a to karboxylaci proteinů (Valko et al., 2006; Birben et al., 2012). Další důležitou funkcí GSH je regenerace jiných neenzymových antioxidantů jako jsou vitamin E a C, pro které GSH vystupuje jako donor elektronu.

GSH se vyskytuje v cytosolu, v mitochondriích a v jádrech buněk. Oproti ostatním neenzymovým antioxidantům se v buňce vyskytuje ve vysoké koncentraci ($10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Při nadměrné tvorbě ROS se v buňkách zvyšuje koncentrace oxidovaného GSSG, v důsledku reakce jeho redukované formy s ROS. Stanovením poměru GSSG/GSH lze hodnotit míru oxidačního stresu (Valko et al., 2006).

2.3.2.2 Vitamin C

Vitamin C, chemickým názvem kyselina askorbová, je neenzymový antioxidant rozpustný ve vodě. Díky této vlastnosti může působit uvnitř i vně buňky. Je to dvojsytná kyselina, která obsahuje dvě hydroxylové skupiny (Konupková, 2020).

Antioxidační vlastnosti kyseliny askorbové spočívají v předání elektronů při reakci s ROS, čímž je redukuje na netoxické molekuly. Při reakci s ROS vznikají její oxidované formy, kyselina monodehydroaskorbová při odevzdání jednoho elektronu a kyselina dehydroaskorbová při odevzdání druhého elektronu (Kašparová et al., 2005). Vitamin C

chrání buněčné membrány před peroxidací lipidů odstraněním $\cdot\text{OH}$ a $\cdot\text{OOR}$ (Valko et al., 2006).

Jednotlivé oxidované formy vitamínu C lze regenerovat zpět na kyselinu askorbovou. Regenerace kyseliny dehydroaskorbové probíhá za přítomnosti GSH jako dárce elektronu a za katalýzy dehydroaskorbátoreduktasy (DHAR, EC 1.8.5.1). Při regeneraci kyseliny monodehydroaskorbové působí jako donor elektronů NADH a reakce je katalyzována monodehydroaskorbátoreduktasou (MDHAR, EC 1.6.5.4) (Do et al., 2016).

Vitamin C se vyskytuje v pylu, ale bylo prokázáno, že jeho obsah nemá zřejmě značný vliv na přítomnou hladinu vitamínu C u včel a předpokládá se, že včela je schopna tento vitamin syntetizovat nebo jsou za syntézu vitamínu C zodpovědní včelí symbiotické mikroorganismy (Brodschneider & Crailsheim, 2010; Pereira De Melo & De Almeida-Muradian, 2010).

2.3.2.3 Vitamin E

Vitamin E má 8 isoform, a to α -, β -, γ -, a δ -tokoferol a α -, β -, γ -, a δ -tokotrienol. Nejvýznamnější isoformou je α -tokoferol (Niki, 2014). Vitamin E je rozpustný v tucích a vyskytuje se v buněčných membránách v lipidové dvojvrstvě. Zde chrání lipidy před oxidačním poškozením, a to především eliminací peroxylových radikálů. Mechanismus průběhu odstranění peroxylového radikálu spočívá v předání elektronu a vodíkového radikálu z α -tokoferolu peroxylovému radikálu, za vzniku α -tokoferolového radikálu. α -tokoferolový radikál může být regenerován zpět do původního stavu kyselinou askorbovou a glutathionem (Kojo, 2005).

Včely získávají vitamin E z potravy, především z pylu (Pereira De Melo & De Almeida-Muradian, 2010).

2.3.2.4 Karotenoidy

Karotenoidy jsou přírodní barviva, která plní mimo jiné funkci neenzymových antioxidantů. Z chemického hlediska jsou karotenoidy konjugované isoprenoidy s dlouhým uhlíkovým řetězcem. Jedná se o velmi rozsáhlou skupinu, bylo identifikováno více než 700 jejich struktur (Blount & McGraw, 2008). Antioxidační funkce karotenoidů spočívá v návratu excitovaného elektronu singletového kyslíku do původního stavu, tedy na molekulární kyslík, za štěpení karotenoidu na menší jednotky. Dále také

karotenoidy zamezují nadměrné peroxidaci lipidů redukcí peroxylového radikálu (Heath et al., 2013).

Karotenoidy u hmyzu podporují imunitní reakci tím, že degradují ROS vznikající při oxidačním procesu. Dalšími funkcemi karotenoidů u hmyzu, mimo jejich antioxidační vlastnosti, je barevná pigmentace nebo jsou prekurzory hormonů, například feromonů (Heath et al., 2013).

Karotenoidy se vyskytují v pylu, nejvíce lutein, β -karoten, xantofyl a fukoxanthin. Včely přijímají karotenoidy potravou (Pereira De Melo & De Almeida-Muradian, 2010; Sandmann, 2019).

2.3.2.5 Neenzymové antioxidanty vyskytující se u včel

U včely medonosné jsou neenzymové antioxidanty exogenního nebo endogenního původu. Endogenní neenzymové antioxidanty jsou například glutathion a vitellogenin. Včela je schopna tyto antioxidanty syntetizovat. Exogenní jsou například vitamin E a karotenoidy, ty musí včely přijímat potravou, vyskytují se např. v pylu (Chaitanya et al., 2016; Konupková, 2020).

Vitamin C je, mimo svou antioxidační funkci, také kofaktorem enzymů (např. monooxygenasy), či regulátor genové exprese (Tawfik et al., 2020). Syntéza vitaminu C je regulována přítomnou hladinou glutathionu a včela je schopna korelovat produkci či odbourání vitaminu C na základě jeho obsahu v přijímané potravě (Farjan et al., 2012).

Vitellogenin je hlavní neenzymový antioxidant u včel. Jedná se o protein produkovaný ve včele tukovým tělískem, který cirkuluje v hemolymfě, a je prekurzorem žloutkového proteinu (Münch et al., 2008). Ve včelím organismu zastává několik funkcí. Slouží jako donor živin při vývoji oocytů u včelí matky, dále slouží jako antioxidační obrana. Vitellogenin je schopen vázat struktury z povrchu patogenních buněk a přenést je do oocytů, kde tak dochází k imunizaci budoucích včel (Havukainen et al., 2013; Kramer et al., 2021).

Antioxidační schopnost vitellogeninu spočívá v jeho přednostní oxidační karboxylaci působením ROS, čímž chrání ostatní biomolekuly ve svém okolí (Seehuus et al., 2006; Kramer et al., 2021). Vitellogenin je schopný se v buňce vázat na eukaryotické organely, jako jsou mitochondrie, a chránit tak membránové lipidy před oxidačním poškozením (Havukainen et al., 2013).

Antioxidační ochrana bývá spojována s množstvím vitellogeninu v organismu. Obecně včely s nízkou koncentrací vitellogeninu v hemolymfě jsou náchylné k oxidačnímu poškození. Kromě toho i dlouhověkost u zimní generace dělnic je v porovnání s jejich letní generací spojována s vyšší koncentrací vitellogeninu u těchto včel (Nikolenko et al., 2012; Aurori et al., 2014). Vysoká exprese genu pro vitellogenin je zřejmě rovněž spjata s dlouhověkostí včelích matek (Kramer et al., 2021).

Produkce vitellogeninu je kontrolována hladinou juvenilního hormonu (JH). Pokud je hladina juvenilního hormonu v hemolymfě nízká, produkuje se více vitellogeninu a u včely je bráněno nadměrné tvorbě oxidačního poškození a naopak (Seehuus et al., 2006). Hladina juvenilního hormonu je obecně spjata s věkem. U mladé dělnice letní generace je hladina JH nízká a vitellogeninu vysoká. Hladina JH se se stářím včely postupně zvyšuje. U létavky je hladina JH zvýšená, čímž dochází k nižší tvorbě vitellogeninu, což může mít za následek hromadění oxidačních produktů a urychlení stárnutí jedince (Dostálková et al., 2020; Amdam et al., 2012).

Vysoké koncentrace vitellogeninu se vyskytují u matky, mladých dělnic a zimní generace včel. Vyšší hladina vitellogeninu je spojována s dlouhověkostí u včel (Nikolenko et al., 2012; Orčić et al., 2017).

2.4 SIGNÁLNÍ ROLE ROS V BUŇCE

Účinky ROS jsou v rámci živých organismů dány jejich přítomnou hladinou v buňce. Při nadměrné produkci ROS, které nedostačuje antioxidační systém buňky, dochází k poškození biomolekul. Pokud je však hladina ROS udržována na fyziologické úrovni, mají v buňce zásadní pozitivní funkci. ROS totiž působí jako poslové v redoxní signalizaci. Redoxní signální molekuly jsou klíčové jednak pro mezibuněčnou komunikaci, ale také pro regulaci dějů uvnitř buňky (Schieber & Chandel, 2014). Komunikace buňky s vnějším prostředím sestává ze signální transdukce, tedy z přenosu signálu z vnějších prostor do vnitřních navázáním ligandu (např. hormon, cytokin, neurotransmitter) na membránový receptor. Přenos signálu je buď jednostupňový nebo je vícestupňový a šíří se prostřednictvím tzv. signální kaskády (Valko et al., 2006). Receptor po navázání ligandu předá signál sekundárnímu poslu (např. H_2O_2), který se podílí na dalším přenosu signálu k efektorové molekule i proteinu (Zamocky et al., 2008).

Na redoxní signalizaci se podílí především peroxid vodíku, v menší míře pak i superoxidový anion radikál (Sies & Jones, 2020).

Příkladem signální role ROS je reverzibilní redoxní konformační změna proteinu. Ta je zprostředkována H_2O_2 , který oxiduje thiolovou skupinu cysteinu z polypeptidového řetězce příslušného proteinu. Dochází ke vzniku disulfidové vazby uvnitř daného proteinu, případně mezi dvěma proteiny. To vyvolá konformační změny, čímž se změní vlastnosti proteinu s dopadem na jeho funkci, např. enzymovou aktivitu. Zpět do původního stavu lze protein vrátit působením thioredoxinu (Schieber & Chandel, 2014; Sies & Jones, 2020).

Superoxidový anion radikál se buněčné signalizace podílí především inhibicí enzymů jako je například akonitasa. V tomto případě inhibice probíhá tak, že $\cdot O_2^-$ oxiduje [Fe-S] klastry a uvolní z nich Fe^{2+} . Inhibice se projeví snížením aktivity enzymu (D'Autréaux & Toledano, 2007).

2.5 OXIDAČNÍ POŠKOZENÍ

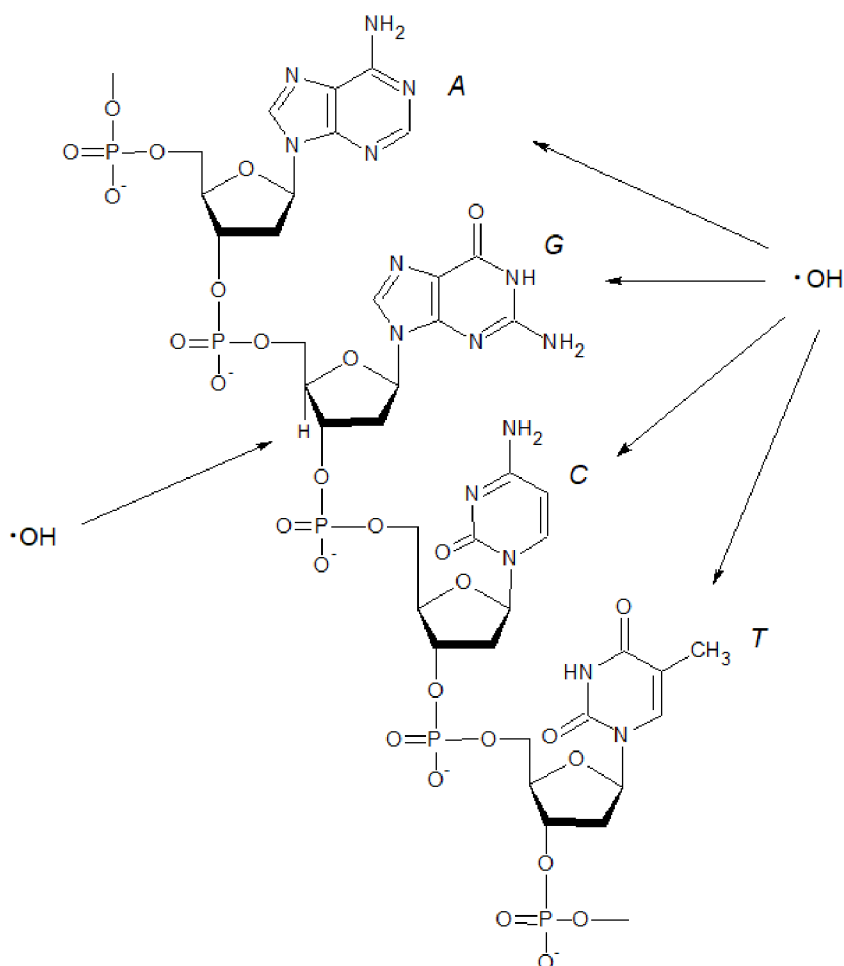
Za podmínek, kdy buněčná produkce ROS výrazně převyšuje antioxidační kapacitu buňky, nastává jev, který se nazývá oxidační stres. ROS oxidují přímo či nepřímo důležité biomolekuly jako jsou lipidy, proteiny či DNA, které jsou tak poškozovány. Případně dochází k řetězovým reakcím generujícím další radikály, které reagují se svým okolím, čímž dochází k poškozování a degradaci řady buněčných struktur. Oxidačně poškozené biomolekuly se hromadí v buňkách, ztrácí svou funkci a způsobují nevratné poškození organismu, které často vede k buněčné smrti a potažmo stárnutí organismu (Birben et al., 2012; Dabrowska & Wiczkowski, 2017).

Oxidační stres je u včely medonosné spojován s hromaděním oxidačních produktů, které má za následek jejich stárnutí a předčasný úhyn. Bylo prokázáno, že létavky jsou náchylnější k hromaděni oxidovaných proteinů v hlavě více než krmičky, kvůli dlouhým letům mimo úl. Naopak v hrudníku je hladina poškozených proteinů podobná, díky zvýšené aktivitě antioxidačních enzymů v letovém svalstvu létavek (Nikolenko et al., 2012; Cervoni et al., 2017).

Oxidační poškození lipidů spočívá v jejich peroxidaci, zatímco u proteinů dochází ke karboxylaci. Při peroxidaci lipidů vzniká 4-hydroxynonenal a malondialdehyd, které se stanovují jako tzv. biomarkery oxidačního poškození (Simone-Finstrom et al., 2016). Dalšími ukazateli míry oxidačního poškození jsou karboxylované proteiny a 8-hydroxy-2'-deoxyguanosin, který je produktem poškození DNA (Nikolenko et al., 2012; Margotta et al., 2018).

2.5.1 Oxidační poškození DNA

Za oxidační poškození DNA je zodpovědný především $\cdot\text{OH}$. Ten může reagovat s purinovými a pyrimidinovými dusíkatými bazemi, a také s 2'-deoxyribosou (Obr. 14). Oxidací těchto složek v DNA může docházet k jednovláknovým nebo dvouvláknovým zlomům nebo křížovým vazbám s proteiny (Dabrowska & Wiczowski, 2017).



Obrázek 14: Znázornění cílů pro hydroxylový radikál u purinových bází adeninu a guaninu, u pyrimidinových bází cytosinu a thyminu a u 2'-deoxyribosy v řetězci DNA, převzato z: (Dizdaroglu, 2012), vytvořeno v ChemSketch.

Sacharidová složka v DNA řetězci je atakována hydroxylovým radikálem. Dochází tak k odtržení vodíkového radikálu z jednoho uhlíku (C1-C5) za vzniku radikálu deoxyribosy. Následně dochází k rozevření furanosy a vzniku karbonylové skupiny na atomu uhlíku, který byl radikálem. Nebo dochází k tvorbě laktonu reakcí C1-radikálu deoxyribosy s vodou a uvolněním baze. V důsledku uvolnění baze dochází k přerušení vlákna a následné tvorbě zlomu ve dvoušroubovici DNA (Dizdaroglu, 2012).

K poškození pyrimidinové baze v řetězci DNA dochází atakem $\cdot\text{OH}$ na dvojnou vazbu mezi uhlíky C5 a C6 baze. Pokud se po zániku π vazby $-\text{OH}$ naváže na C5 vznikne radikál na C6 a naopak. U thyminu může dojít ke vzniku allylového radikálu odtržením vodíkového radikálu z methylové skupiny. Radikály pyrimidinových bazí mají následně oxidační vlastnosti. Bez přítomnosti kyslíku a za přítomnosti vody dochází k oxidaci radikálu thyminu a následné deprotonaci za vzniku thyminglykolu. Stejně tak u radikálu cytosinu dochází k tvorbě cytosinglykolu. Cytosinglykol může podlehnout deaminaci za vzniku uracilglykolu, který lze dehydratovat na 5-hydroxyuracil, nebo dehydratací cytosinglykolu dochází ke vzniku 5-hydroxyuracilu. V přítomnosti kyslíku jsou radikály pyrimidinových bazí náchylné k tvorbě peroxylových radikálů, které jsou nestabilní a rozkládají se na další produkty oxidačního poškození DNA. Například peroxyradikál cytosinu se rozkládá na kyselinu dialurovou, která je oxidována v přítomnosti kyslíku na alloxan, který se může redukovat na 5-hydroxyhydantion. Oxidací allylového radikálu vzniká 5-(hydroxymethyl)uracil a 5-formyluracil (Cooke et al., 2003; Dizdaroglu, 2012).

U purinových bazí hydroxylový radikál atakuje dvojnou vazbu mezi C4-C5 nebo N7-C8, po zániku π vazby se $-\text{OH}$ naváže na jeden atom z atakované dvojice (a to C4-OH, C5-OH, či C8-OH) a na druhém atomu dochází ke vzniku radikálu. U adeninu vznikne vazbou $-\text{OH}$ na 4C radikál na uhlíku C5 (4C-OH-A radikál) nebo se utvoří 8C-OH-A radikál. Působením $\cdot\text{OH}$ na guanin může dojít ke vzniku 4C-OH-G, 5C-OH-G nebo 8C-OH-G radikálu. Radikály purinů se mohou oxidovat nebo redukovat. Redukcí jedním elektronem 8C-OH-purinů může dojít k otevření imidazolového kruhu a ke vzniku 4,6-diamino-5-formaidopyrimidinu z adeninu a 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidinu z guaninu. Pokud ale při redukci nedojde k otevření imidazolového kruhu vznikají hemioorthoamidy purinových bazí. Jednoelektronovou oxidací 8C-OH-purinů vzniká 8-hydroxyadenin a 8-hydroxyguanin (Cooke et al., 2003; Dizdaroglu, 2012).

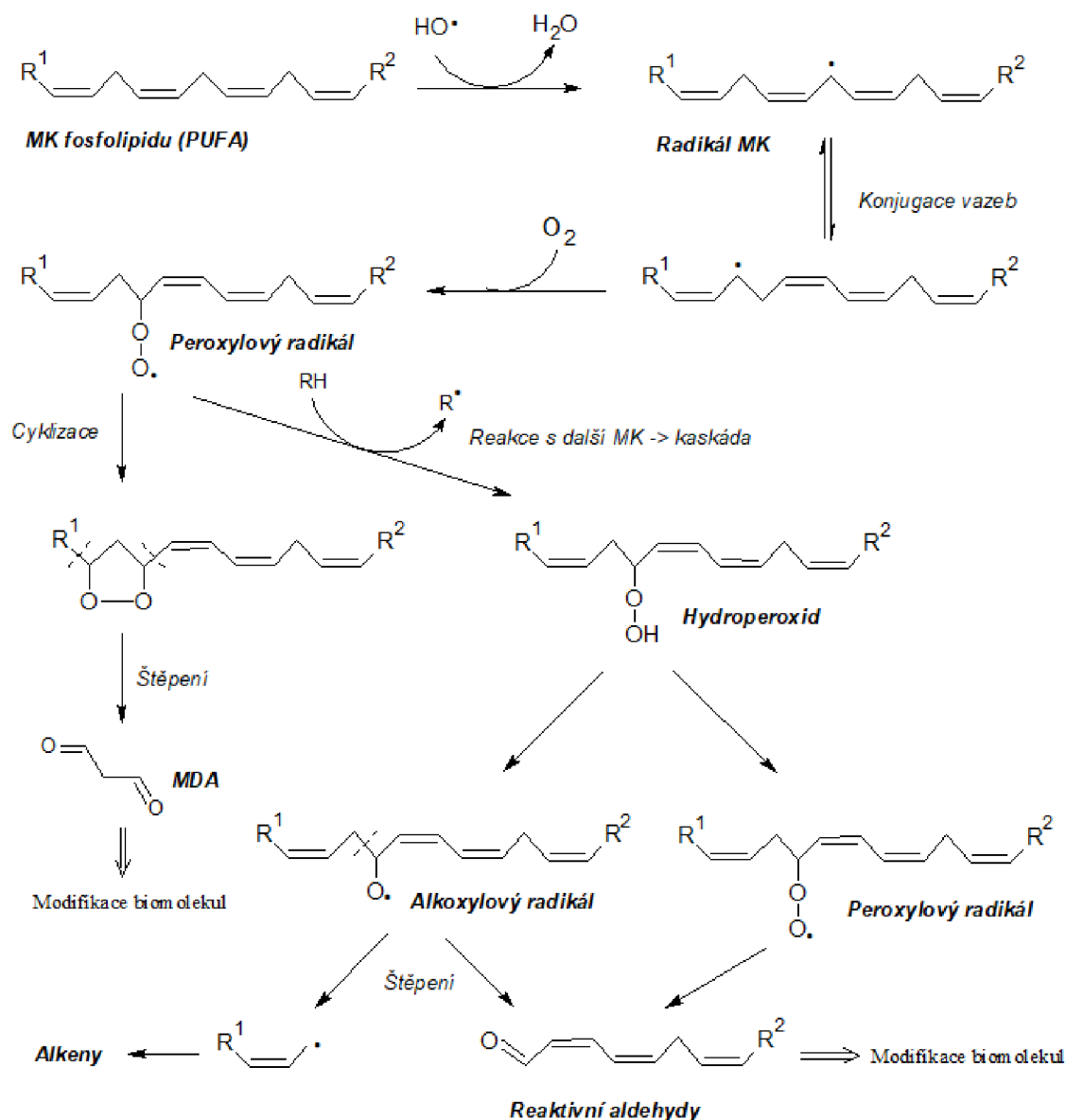
Oxidační poškození genetické informace, uložené v podobě DNA, může způsobit chyby při replikaci DNA, protože modifikované dusíkaté baze se nepárují správně. Například 8-hydroxy-2'-deoxyguanosin (8-OHdG) se při replikaci spáruje s adenosinem místo s cytidinem. Při další replikaci dochází k tvorbě dvou vláken, z níž jedno obsahuje 8-OHdG, který se spáruje opět s adenosinem. Druhé vlákno obsahující adenosin, špatně spárovaný při první replikaci, se spáruje s thymidinem a tím dojde ke změně páru v DNA z G-C na T-A. V důsledku toho dochází k mutacím, zamezení transkripce nebo ke změnám v signálních drahách (Valko et al., 2006; Dizdaroglu, 2012).

K oxidačnímu poškození DNA dochází v menší míře než k poškození lipidů a proteinů, protože pro kontrolu DNA má buňka vyvinutu řadu kontrolních a opravných mechanismů, které rozpoznají oxidovanou nukleovou kyselinu, odstraní ji, nahradí a obnoví strukturu DNA. Součástí opravných mechanismů jsou enzymy z rodin glykosylas, nukleas, polymeras a ligas (Dizdaroglu, 2012; Dabrowska & Wiczkowski, 2017). DNA v mitochondriích má větší náchylnost k oxidačnímu poškození oproti jaderné DNA z důvodu přítomnosti respiračního řetězce a nedostatečného výskytu nukleoproteinů (např. histonů) (Dabrowska & Wiczkowski, 2017).

2.5.2 Peroxidace lipidů

ROS reagují s lipidy obsahujícími dvojnou vazbu, především s polynenasycenými mastnými kyselinami (PUFA), které jsou důležitou součástí biologických membrán. Tento proces oxidace lipidů v důsledku působení ROS se nazývá peroxidace lipidů a jedná se o neenzymový proces (Yamamoto, 1991; Valko et al., 2006). V buňkách může probíhat i enzymová peroxidace lipidů. Ta je obecně spojována s tvorbou produktů zapojených do určitých regulačních dějů, příkladem je reakce arachidonát-5-lipooxygenasy (ALOX5, EC 1.13.11.34), která katalyzuje peroxidaci kyseliny arachidonové za tvorby leukotrienů (Yamamoto, 1991). Neenzymová peroxidace lipidů je nejčastěji zahájena hydroxylovým radikálem. Dalšími ROS, jejichž účinek vede k peroxidaci lipidů, jsou alkylový ($R\cdot$) a peroxylový radikál ($ROO\cdot$) (Valko et al., 2006).

Neenzymová peroxidace je radikálová řetězová reakce a sestává ze tří fází: iniciace, propagace a terminace (Obr. 15). Fáze iniciace je započata atakem $\cdot OH$ na CH-skupinu mastné kyseliny v místě konjugovaných dvojných vazeb. Působením $\cdot OH$ se odtrhne $\cdot H$ a vznikne radikál mastné kyseliny. V radikálu mastné kyseliny (MK) dojde k přesunu π elektronů z dvojně vazby v blízkosti radikálového uhlíku za vzniku konjugovaného dienu. Následuje spontánní reakce konjugovaného dienu s O_2 za vzniku peroxylového radikálu. Ten je málo stabilní a snadno reaguje s další MK, ze které odštěpí $\cdot H$ za tvorby lipidového hydroperoxidu a nového radikálu MK. Touto tvorbou radikálu MK započne propagační fáze, která trvá do té doby, než se radikál setká s jiným radikálem nebo dokud není eliminován neenzymovým antioxidantem (např. vitamin E). Zánik radikálů je terminační fází iniciované řetězové reakce (Lízalová, 2010).



Obrázek 15: Schéma peroxidace PUFA iniciované $\cdot\text{OH}$ a O_2 za vzniku peroxylového radikálu, který se dále může cyklizovat nebo reagovat s MK. Konečné produkty reaktivní aldehydy, alkeny vznikají štěpením alkoxylových a peroxylových radikálů a cyklizačních produktů. Převzato z: (Štípek, 2000), vytvořeno v ChemSketch.

Vzniklé lipidové hydroperoxydy se mohou eliminační reakcí rozložit na sekundární produkty peroxidace lipidů (Obr. 15) (Dabrowska & Wiczowski, 2017). Těmito sekundárními produkty jsou příslušné reaktivní aldehydy či alkeny. Nejzastoupenějšími reaktivními aldehydy jsou malondialdehyd (MDA), 4-hydroxynonenal (4-HNE) a α,β -nenasycené aldehydy (Ayala et al., 2014). MDA a 4-HNE mají vyšší stabilitu než

ROS, mohou procházet buněčnou membránou a dále oxidačně poškozovat proteiny (Birben et al., 2012; Al-Menhali et al., 2020).

Peroxidací lipidů v buněčných membránách dochází k narušení fosfolipidové dvojvrstvy, což může způsobit propustnost buněk a nefunkčnost membránových receptorů (Birben et al., 2012). Peroxidačním modifikacím podléhají i další lipidy, např. cholesterol a glykolipidy (Ayala et al., 2014).

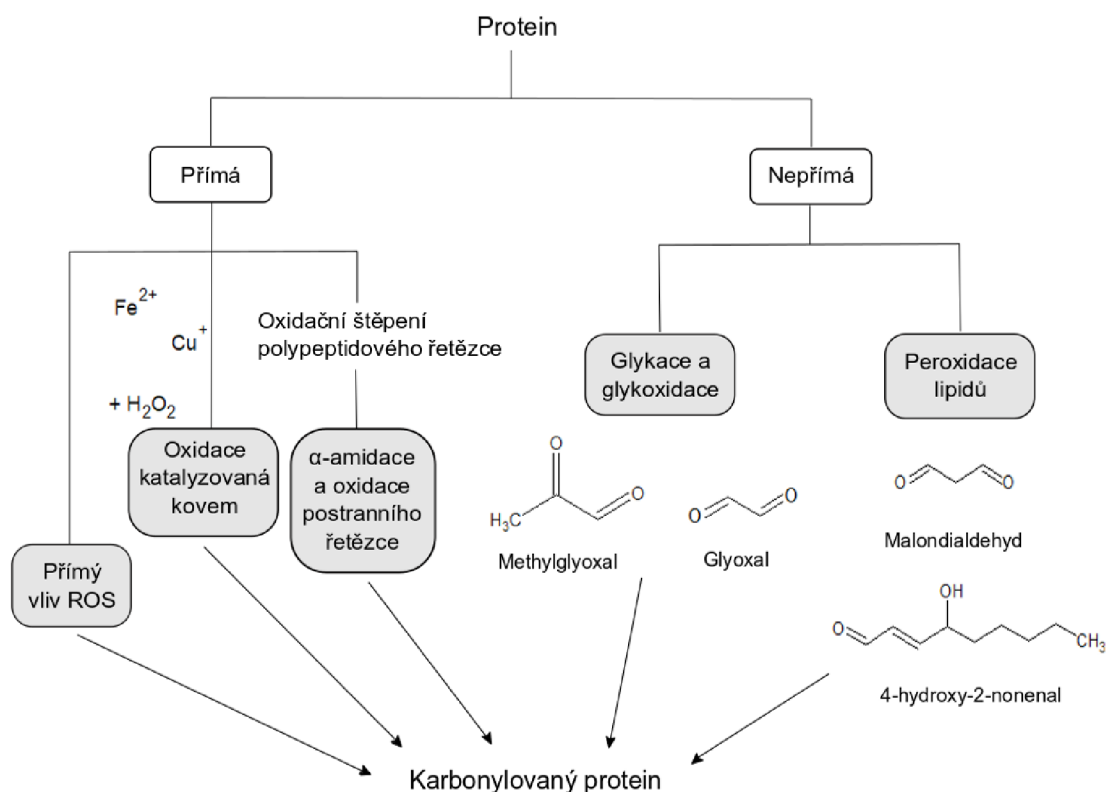
Při nízkém stupni peroxidace jsou buňky schopny opravnými mechanismy a přítomnými antioxidanty minimalizovat negativní dopad na membrány a další lipidy podléhající peroxidaci. Při vysokém stupni peroxidace jsou opravy nedostatečné a dochází k poškození buněk až k buněčné smrti, což je často spojováno s patofyziologickými procesy (např. u člověka je to ateroskleróza nebo rakovina) a také stárnutím organismu (Ayala et al., 2014).

2.5.3 Karbonylace proteinů

Proteiny jsou v organismech nejzastoupenější biomolekuly, které ve velké míře čelí působení ROS (Driessen et al., 2015). Proteiny zastávají v buňce mnoho funkcí, které jsou dané jejich strukturou, např. transport molekul, enzymová aktivita, ochranná funkce, atd. A právě ve struktuře proteinů dochází k modifikacím, které mají za následek poškození proteinu a narušení jeho funkce (Trnková et al., 2015).

Nejčastější oxidační poškození proteinů je jejich karbonylace, při kterém dochází k oxidaci aminokyselin (AK), tedy stavebních jednotek proteinů, převážně za vzniku odpovídajících karbonylovaných derivátů, aldehydů, případně ketonů. Karbonylace proteinů je tedy posttranslační modifikace, při níž se zavádějí karbonylové skupiny do AK polypeptidového řetězce. Jedná se o ireversibilní proces, který nelze zvrátit žádným opravným systémem (Bachi et al., 2013; Augustyniak et al., 2015; Hecker & Wagner, 2018).

Karbonylace proteinu může nastávat na různých místech polypeptidového řetězce a může probíhat přímým nebo nepřímým mechanismem (Obr. 16).

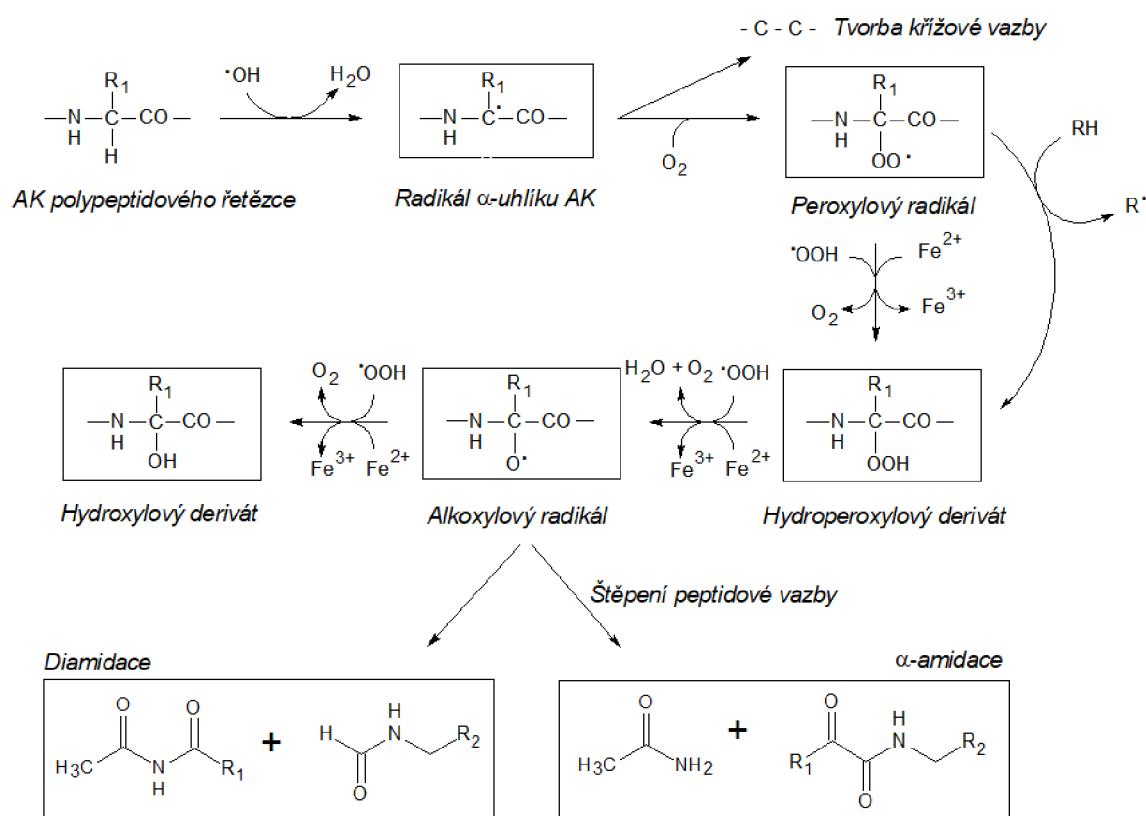


Obrázek 16: Schéma přímé a nepřímé karbonylace proteinu. Přímá karbonylace proteinů probíhá buď přímým vlivem ROS, za katalýzy kovem, α -amidací nebo při oxidaci postranního řetězce AK. Nepřímá karbonylace proteinů probíhá reakcí s reaktivními aldehydy vytvořenými při peroxidaci lipidů nebo oxidaci sacharidů. Převzato z: (Rodríguez-García et al., 2020), vytvořeno pomocí ChemSketch, Inkscape.

Přímý karbonylační mechanismus spočívá v přímém ataku aminokyselin ROS, v oxidaci postranních řetězců AK za katalýzy kovem nebo v oxidačním štěpení polypeptidového řetězce. Při nepřímém mechanismu dochází ke karbonylaci, která je způsobena reaktivními aldehydy vznikajícími při oxidaci sacharidů (methylglyoxal, glyoxal) nebo peroxidací lipidů (MDA, 4-HNE). Reaktivní aldehydy jsou zaváděny do proteinů kovalentní vazbou s AK lysinem, cysteinem nebo argininem (Dalle-Donne et al., 2006; Hecker & Wagner, 2018; Rodríguez-García et al., 2020). Interakcí methylglyoxalu s proteinem dochází u proteinu ke zvýšení jeho potencionálu pro vazbu kovových iontů, a také dochází ke křížovým vazbám mezi takto modifikovaným proteinem a DNA (Tu et al., 2013).

Přímý účinek ROS na polypeptidový řetězec (Obr. 17) spočívá v ataku polypeptidového řetězce $\cdot\text{OH}$ za vzniku radikálu α -uhlíku AK, který dále reaguje s jiným α -uhlíkovým radikálem za vzniku křížové vazby, nebo reaguje s O_2 za tvorby

peroxylového radikálu. Dále peroxylový radikál odtrhne vodíkový radikál z jiné AK stejného nebo jiného blízkého proteinu za vzniku hydroperoxylového derivátu proteinu. Hydroperoxylový derivát také vzniká působením hydroperoxylového radikálu na peroxylový radikál za přítomnosti přechodného kovu. Stejným typem reakce pak vzniká alkoxylový radikál a následně hydroxylový derivát proteinu (Obr. 17). Ve fázi alkoxylového radikálu dochází ke štěpení peptidové vazby za vzniku karbonylových derivátů α -amidací nebo diamidací (Trnková et al., 2015; Dabrowska & Wiczowski, 2017). Při α -amidaci je štěpena vazba mezi α -uhlíkem a dusíkem za vzniku odpovídajícího amidu a ketonu polypeptidu. Při diamidaci je štěpena vazba mezi α -uhlíkem a CO-skupinou za tvorby imidu a amidu polypeptidu (Hellwig et al., 2015).



Obrázek 17: Oxidace polypeptidového řetězce iniciovaná $\cdot\text{OH}$ za aerobních podmínek. Vzniká radikál α -uhlíku v důsledku odtržení $\cdot\text{H}$ hydroxylovým radikálem, dále dochází buď k tvorbě křížové vazby nebo k reakci s kyslíkem, což má za následek vznik peroxylového radikálu. Peroxylový radikál buď odtrhne vodík jiné aminokyseliny ze stejného nebo jiného proteinu za tvorby hydroperoxylového derivátu proteinu nebo na peroxylový radikál působí hydroperoxylový radikál za přítomnosti kovu a vzniká hydroperoxylový derivát proteinu. Následuje vznik alkoxylového radikálu a hydroxylového derivátu proteinu působením hydroperoxylového radikálu za přítomnosti kovového iontu. Na alkoxylovém radikálu může docházet ke štěpení peptidové vazby α -amidací či diamidací za tvorby proteinových derivátů. Převzato z: (Trnková et al., 2015), vytvořeno v ChemSketch.

ROS kromě polypeptidového řetězce také oxidují postranní řetězce AK. Nejvíce citlivé pro tuto oxidaci jsou AK residua cystein a methionin, jelikož obsahují ve svém postranním řetězci atom síry. Oxidace cysteinu vede k tvorbě disulfidů v rámci jednoho proteinu, a to tvorbou S-S vazby u dvou blízkých AK, nebo tímto způsobem může dojít ke spojení dvou AK různých proteinů. Proteiny modifikované křížovou vazbou se stávají odolnějšími vůči proteolytické degradaci, a také mohou bránit degradaci dalších oxidačně poškozených proteinů (Birben et al., 2012; Trnková et al., 2015).

Karbonylace zprostředkovaná kovem se odehrává vazbou redukované formy iontu kovu (Fe^{2+} , Cu^+) na cílový protein. Kov poté reaguje s H_2O_2 a Fentonovou reakcí vzniká $\cdot\text{OH}$, který atakuje AK (např. lysin) nacházející se v blízkosti navázaného kovu za tvorby radikálu uhlíku nacházejícího se na N-konci řetězce. Následně dochází ke tvorbě dvojné vazby mezi tímto radikálem a N-koncem řetězce za vzniku derivátu iminu. Hydrolyzou tohoto derivátu iminu vzniká příslušný aldehyd (Stadtman & Levine, 2003; Trnková et al., 2015).

Jelikož je karbonylace proteinů nevratný děj, dochází k hromadění takto modifikovaných proteinů v buňce. Při nižších hladinách karbonylových derivátů jsou poškozené proteiny rozpoznány a degradovány v proteasomu. Ale jelikož je proteasom enzymový komplex, je také náchylný ke karbonylaci, a tak při zvyšujícím se oxidačním stresu je karbonylován a přichází o svou funkci (Bachi et al., 2013; Hecker & Wagner, 2018).

Hromadění karbonylovaných proteinů vede ke ztrátě proteinových funkcí, k porušení a rozpadu membrán, k dysfunkci buněk až k buněčné smrti (Bachi et al., 2013; Dabrowska & Wiczowski, 2017; Hecker & Wagner, 2018). Jelikož se karbonylace účastní produkty jiných oxidačních drah, jako je peroxidace lipidů, jsou karbonylované proteiny dobrým ukazatelem oxidačního stresu (Rodríguez-García et al., 2020).

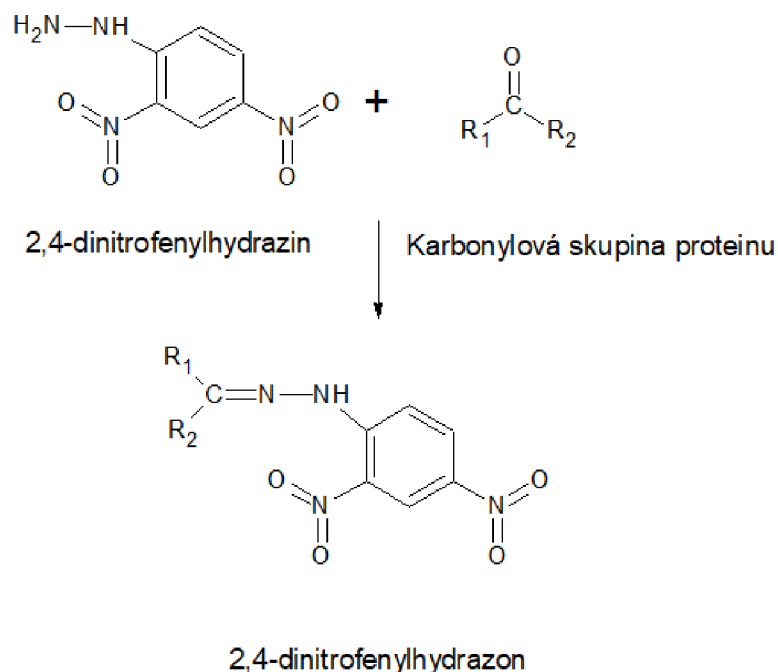
2.6 METODY STANOVENÍ KARBONYLACE PROTEINŮ

Míru oxidačního stresu lze hodnotit stanovením produktů oxidačního poškození, jinak známé pod označením biomarkery oxidačního poškození, jako je MDA, 4-HNE, karbonylované proteiny a 8-OHdG (Taric et al., 2020; Tawfik et al., 2020). Metody, které se používají pro určení rozsahu oxidačního stresu detekcí biomarkerů oxidačního poškození, jsou spektrofotometrické stanovení, hmotnostní spektrometrie nebo imunochemické metody, a to ELISA či Western blot (Dalle-Donne et al., 2003;

Augustyniak *et al.*, 2015). Pro usnadnění lze využít komerční kity, specifické pro detekci a kvantifikaci daného produktu oxidačního poškození, například pro imunochemickou analýzu karbonylovaných proteinů Western blotem lze využít tzv. OxyBlot kit (Seehuus *et al.*, 2006).

Jelikož se většinou obsah karbonylovaných proteinů vztahuje na obsah 1 mg proteinu ve vzorku, je potřeba nejdříve stanovit celkovou koncentraci proteinů ve stanovovaném vzorku (Colombo *et al.*, 2016). Zjistit celkovou koncentraci proteinů ve vzorku lze např. metodou s kyselinou bicinchoninovou (BCA) či Bradfordovou metodou. Bradfordova metoda je založena na interakci barviva Coomassie Brilliant Blue G-250 s proteiny za vzniku modrého zbarvení, které se stanovuje spektrofotometricky při 595 nm s využitím BSA jako standardu pro sestavení kalibrační křivky (Kruger, 2009). U BCA metody reaguje protein s Cu^{2+} v alkalickém prostředí, přičemž dochází k redukci iontů mědi na Cu^+ a jejich následné chelataci BCA za tvorby barevného komplexu. Vzniklé fialové zbarvení komplexu se stanovuje spektrofotometricky při 562 nm (Walker, 1994).

Pro detekci karbonylovaných proteinů se využívá derivatizace karbonylové skupiny modifikovaného proteinu s 2,4-dinitrofenylhydrazinem (DNPH) za tvorby 2,4-dinitrofenylhydrazonu (DNP), jelikož samotnou karbonylovou skupinu lze velmi těžko detekovat (Obr. 18). Obsah DNP, odpovídající množství karbonylovaných proteinů, lze následně stanovit spektrofotometricky, imunochemicky či hmotnostní spektrometrií po předcházející separaci proteinů prostřednictvím vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) (Colombo *et al.*, 2016).

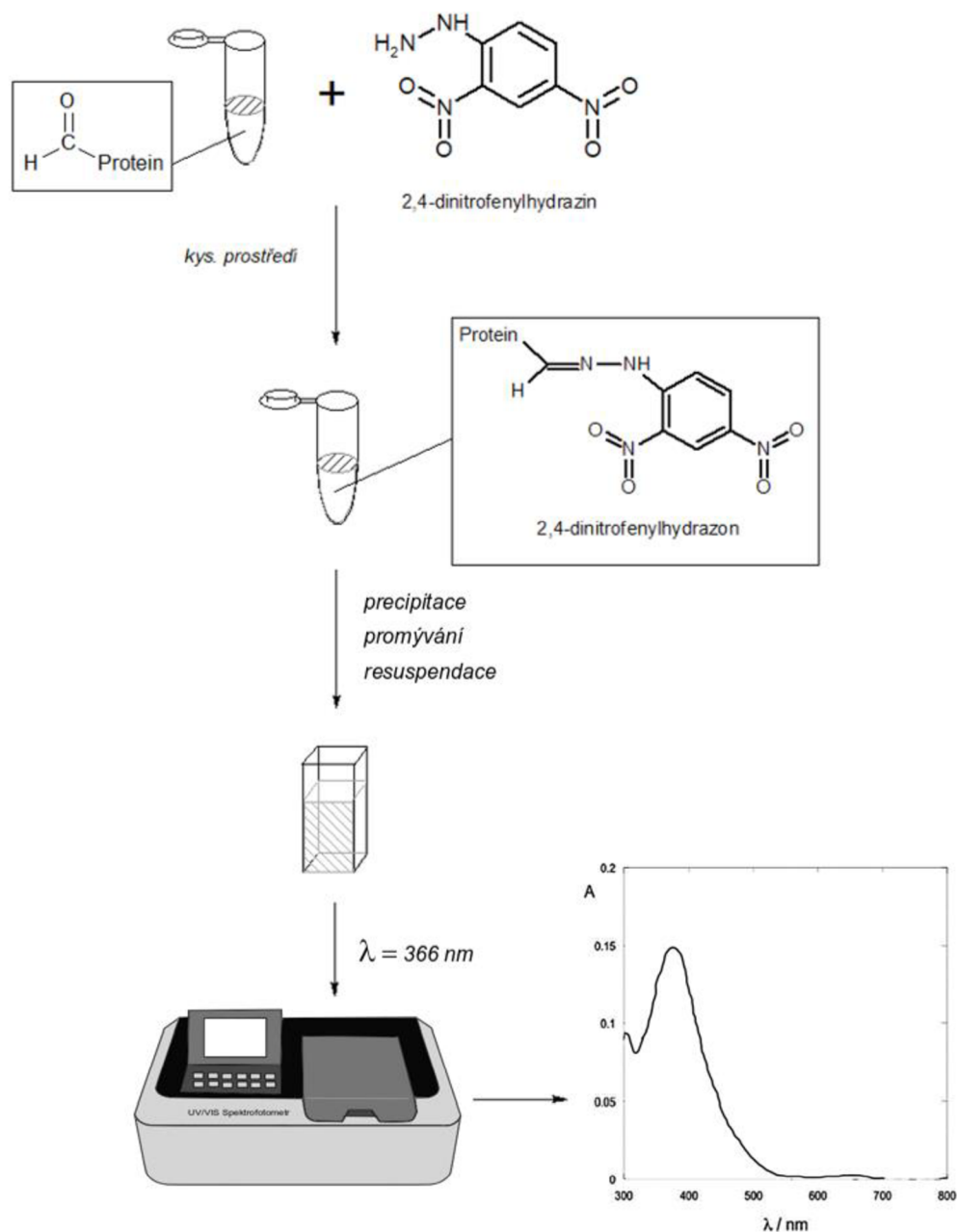


Obrázek 18: Reakcí 2,4-dinitrofenylhydrazinu s karbonylovou skupinou proteinu vzniká 2,4-dinitrofenylhydrazon, který lze detekovat spektrofotometricky nebo imunochemicky po vazbě anti-DNP protilátky. Převzato z: (Colombo et al., 2016). Vytvořeno v ChemSketch.

2.6.1 Spektrofotometrické stanovení karbonylace proteinů

Spektrofotometrické stanovení karbonylovaných proteinů metodou zavedenou Levinem et al. (1990) s využitím 2,4-dinitrofenylhydrazinu, také označovanou jako Levinova metoda, je založeno na reakci karbonylové skupiny proteinu ve vzorku proteinů s DNPH v kyselém prostředí, nejčastěji 0,2 % DNPH v $2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ HCl. Vzniká DNP derivát, který absorbuje světelné záření v UV/VIS oblasti s absorpčním maximem mezi 365-375 nm (Obr. 19). Po derivatizaci proteinu s DNPH se provádí kroky precipitace proteinů, promývání a resuspendování proteinů, protože je potřeba odstranit nezreagovaný DNPH, který taktéž absorbuje světelné záření okolo 370 nm a tím pádem by interferoval se stanovením karbonylovaných proteinů. Jako blank se při spektrofotometrickém stanovení danou metodou využívá vzorek proteinů s přidanou $2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ HCl bez obsahu DNPH. Absorbanci prvního vzorku měříme v rozmezí vlnových délek od 300 po 500 nm, čímž získáme jeho absorpční maximum (obvykle okolo 370 nm). Postupně změříme absorbanci všech vzorků při vlnové délce absorpčního maxima DNPH navázaného na protein a stanovíme koncentraci karbonylovaných proteinů dosazením do vzorce

(Rovnice 1) nebo výpočtem z kalibrační křivky standardu (např. oxidované BSA) (Colombo et al., 2016; Alomari et al., 2018).

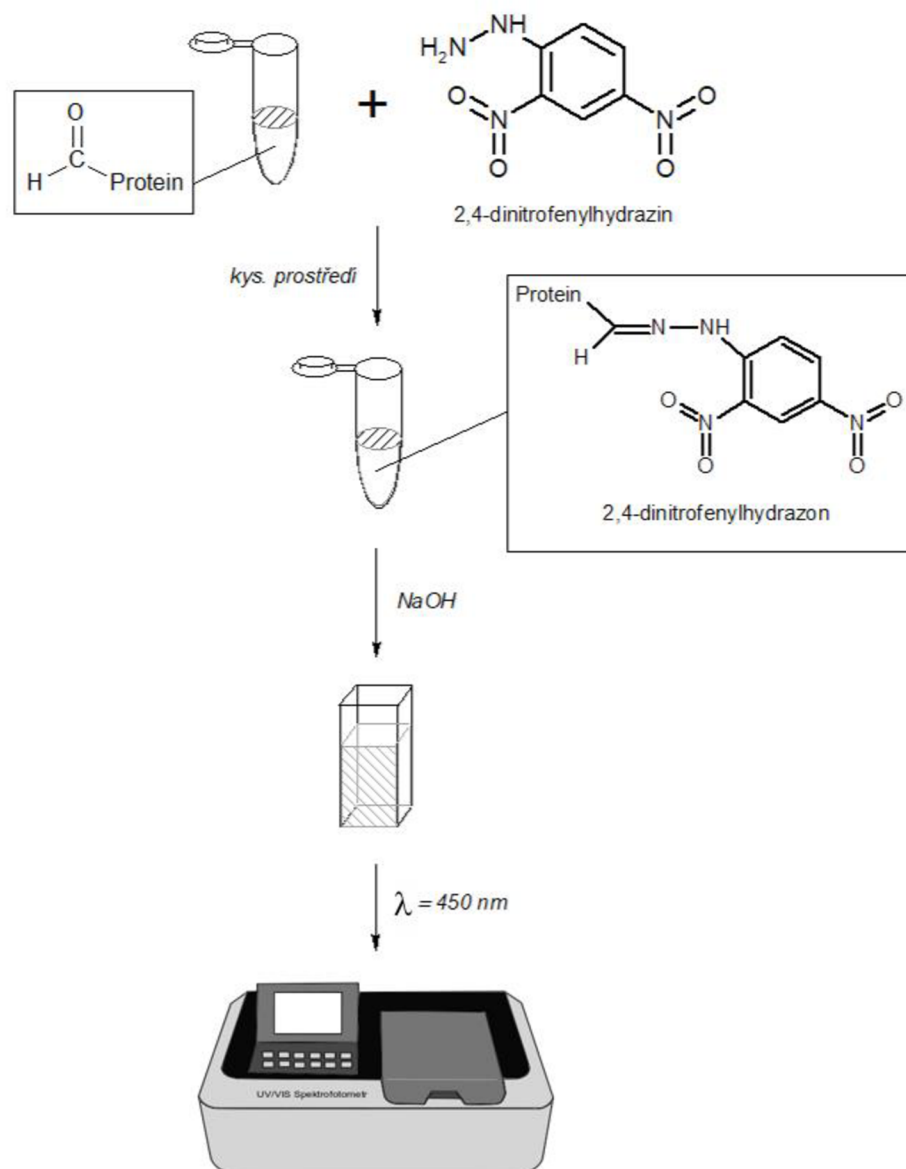


Obrázek 19: Spektrofotometrické stanovení karbonylovaných proteinů s využitím reakce karbonylové skupiny oxidovaného proteinu s 2,4-dinitrofenylhydrazinem (DNPH) v kyselém prostředí za tvorby 2,4-dinitrofenylhydrazonu (DNP). Pro odstranění nezreagovaného DNPH se provádějí kroky precipitace proteinů, opakovaného promývání a následné resuspendace proteinů. Poté se na spektrofotometru měří absorbance vzorků při 366 nm. Převzato z: (Colombo et al., 2016), vytvořeno pomocí: ChemSketch a Inkscape.

$$[PCO] \left(\frac{nmol}{mg \text{ protein}} \right) = \frac{\left[10^6 \times \left(\frac{A_{366nm}}{22\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}} \right) \right]}{[protein]_{mg/ml}}$$

Rovnice 1: Vzorec pro výpočet koncentrace karbonylovaných proteinů z naměřené absorbance po provedení spektrofotometrické metody dle Levine et al. (1990). Převzato z: (Colombo et al., 2016).

Alternativou pro spektrofotometrické stanovení karbonylovaných proteinů výše zmíněnou metodou je její varianta v alkalickém prostředí (Obr. 20). Po zreagování DNPH v kyselém prostředí s karbonylovanými proteiny ve vzorku je k DNP derivátům proteinů přidán NaOH, který způsobí posun absorpčního maxima z 370 nm na 450 nm. To znamená, že nezreagovaný DNPH nebude interferovat, jelikož jeho absorpční maximum je stále při 370 nm. Díky tomu není potřeba provádět precipitační a promývací kroky. Avšak vzhledem k nestabilitě DNP v alkalickém prostředí musí být inkubační doba (tj. 10 minut) po přidání NaOH přísně dodržena (Mesquita et al., 2014; Colombo et al., 2016).



Obrázek 20: Spektrofotometrické stanovení karbonylovaných proteinů v alkalickém prostředí je založeno na přidání NaOH do vzorku s karbonylovanými proteiny derivatizovanými s DNPH, což způsobí posun absorpčního maxima z 370 nm na 450 nm. Převzato z: (Colombo et al., 2016), vytvořeno pomocí: ChemSketch a Inkscape.

Před spektrofotometrickým stanovením karbonylovaných proteinů je potřeba z analyzované směsi odstranit nukleové kyseliny, protože některé nukleové baze, jako například guanin, cytosin či thymin, obsahují karbonylovou skupinu a reagovaly by s DNPH, což by mělo za následek nepřesné měření. K odstranění nukleových kyselin ve vzorku se využívá 1% streptomycin-sulfát, vzorek se centrifuguje a analyzuje se

supernatant s obsahem karbonylovaných proteinů (Dalle-Donne et al., 2003; Luo & Wehr, 2009).

Spektrofotometrické stanovení karbonylovaných proteinů s využitím DNPH je finančně dostupná a poměrně rychlá kvantitativní metoda stanovení obsahu karbonylace proteinů, resp. míry oxidačního poškození, ale neposkytuje informace o karbonylaci jednoho určitého proteinu. Pokud chceme přesnější informace, lze provést separaci proteinů metodou HPLC, poté derivatizaci s DNPH a analýzu na HPLC detektoru nebo následnou hmotnostní spektrometrickou analýzu (Dalle-Donne et al., 2003). Oproti imunochemickým metodám má spektrofotometrické stanovení nižší senzitivitu (Colombo et al., 2016).

2.6.1.1 Stanovení proteinů separovaných HPLC

Separace proteinů vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií je založena na interakci proteinů se stacionární fází, které jsou unášeny mobilní fází v chromatografické koloně. Proteiny reagují s povrchem stacionární fáze na základě specifických kontaktních oblastí molekuly, což ovlivňuje jejich retenční čas (Aguilar, 2004). HPLC chromatograf může sbírat jednotlivé proteinové frakce na základě jejich eluce z kolony. Tyto frakce lze dále analyzovat, například spektrofotometricky či hmotnostní spektrometrickou analýzou (Zheng et al., 2006).

Stanovení karbonylovaných proteinů s využitím separace HPLC je založeno na derivatizaci karbonylovaných proteinů s DNPH a následné frakcionaci v HPLC chromatografické koloně. HPLC separace DNP derivátů proteinů je využívána před provedením spektrofotometrického stanovení karbonylovaných proteinů, jelikož zajišťuje vyšší citlivost a specifičnost pro tuto metodu. Je možno využít detekce v HPLC spektrofotometrickém detektoru, například detektor diodového pole. Druhým způsobem vyhodnocení obsahu karbonylovaných proteinů ve vzorku po jejich separaci pomocí HPLC je hmotnostní spektrometrická analýza (Dalle-Donne et al., 2003; de M. Ochs et al., 2010).

2.6.2 Imunochemické metody pro stanovení karbonylace proteinů

Karbonylované proteiny lze stanovit imunochemicky s využitím derivatizace karbonylovaných proteinů s DNPH za tvorby DNP derivátů proteinů, které se následně stanovují reakcí s primární anti-DNP protilátkou (Colombo et al., 2016).

Zpočátku nebylo možné imunochemicky stanovit míru karbonylace proteinů po derivatizaci s DNPH, ale díky vývoji protilátky proti dinitrofenylu lze nyní detekovat karbonylované proteiny imunochemickými metodami (Colombo et al., 2016). Imunochemické stanovení má vyšší senzitivitu než spektrofotometrické metody, což umožňuje přesnější analýzu i pro vzorky s nižším obsahem karbonylovaných proteinů (Matthijssens et al., 2007). Nejpoužívanější imunochemické metody jsou ELISA a Western blot. Metoda Western blot je založena na elektroforetické separaci proteinů SDS-PAGE, jejich přenesení na membránu a následné detekce po inkubaci se značenými specifickými protilátkami. Metoda ELISA je založena na interakci značených protilátek s antigenem a následném spektrofotometrickém stanovení. Provádí se převážně v mikrodětičkovém uspořádání (Augustyniak et al., 2015).

Oproti spektrofotometrickému stanovení lze imunochemickými metodami stanovit nejen koncentraci karbonylovaných proteinů, ale i identifikovat určité karbonylované proteiny na základě molekulové hmotnosti díky separaci během SDS-PAGE (Dalle-Donne et al., 2003).

2.6.2.1 Stanovení karbonylovaných proteinů metodou Western blot

Western blot je metoda imunochemické detekce proteinů skládající se z několika dílčích kroků: elektroforetické separace proteinů za denaturačních podmínek provedením polyakrylamidové gelové elektroforézy v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE), přenesení proteinů na membránu a jejich následné imunochemické detekci za využití specifických protilátek proti cílovému proteinu (Colombo et al., 2016).

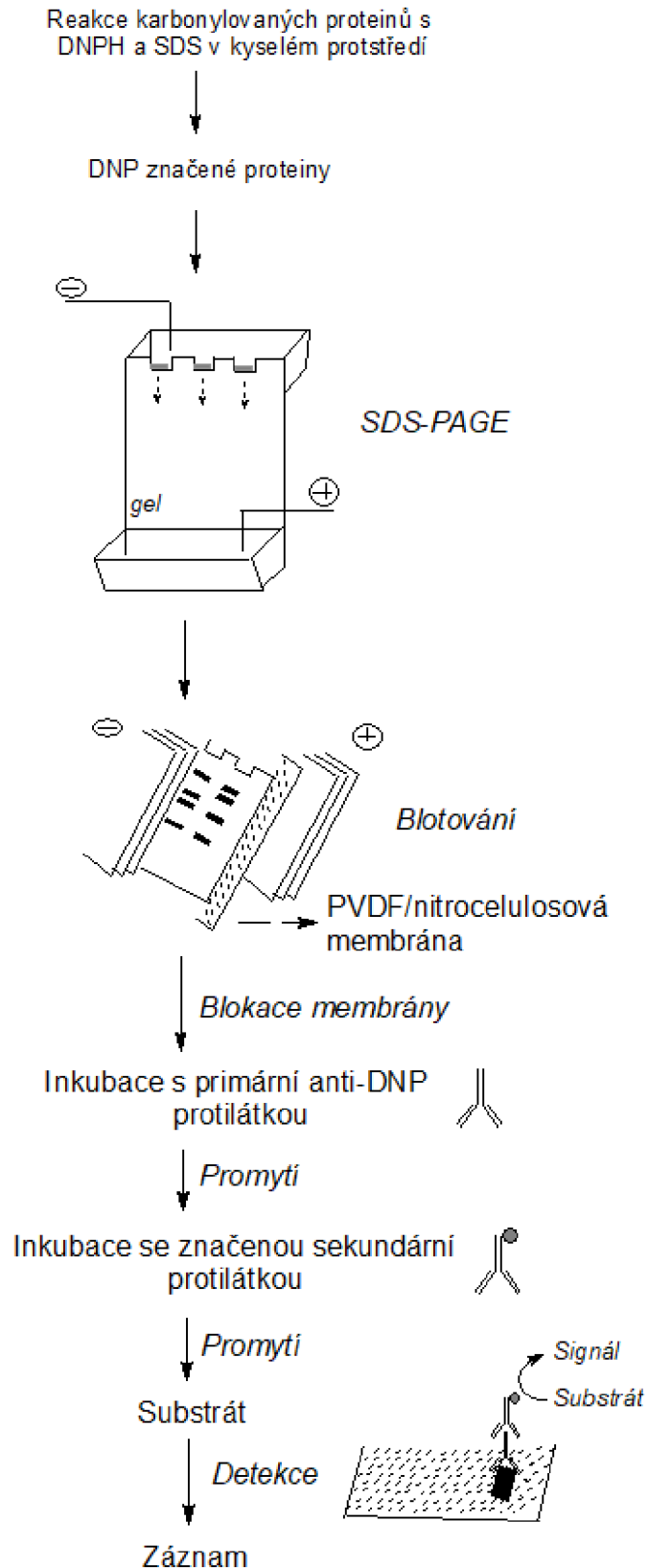
SDS-PAGE probíhá v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS), který dává proteinům ve vzorku záporný náboj. Po zapojení stejnosměrného proudu putují záporně nabitě proteiny gelem k anodě a separují se na základě molekulové hmotnosti (Gallagher, 2006). Nejpoužívanější gel pro SDS-PAGE je polyakrylamidový gel, u kterého lze upravovat velikost pórů v gelu na základě poměru smíchaného bis-akrylamidu a akrylamidu, které je zodpovědné za zesíťování gelu. Standardně se využívá

elektroforézy za diskontinuálních podmínek, kterých je dosaženo použitím zaostřovacího a dělicího gelu lišícími se obsahem akrylamidu a hodnotou pH (Mahmood & Yang, 2012).

Po dokončení SDS-PAGE se separované proteiny přenesou na membránu, nejčastěji nitroceluloseovou nebo na bázi polyvinyliden-difluoridu (PVDF). K přenosu se využívá elektrického proudu, nejčastěji v uspořádání tank blotting nebo semi-dry blotting (Mahmood & Yang, 2012; Colombo et al., 2016). Po přeblovování je potřeba před detekcí membránu blokovat, aby nedošlo k nechtěným vazbám protilátek na povrch membrány mimo detekované proteiny. Pro blokování membrány se používá inertní protein, například nízkotučné mléko, BSA nebo želatina s přídavkem detergentů jako je Tween 20 (Welinder & Ekblad, 2011; Mahmood & Yang, 2012).

Pro vizualizaci se membrána nejdříve inkubuje v pufru s primární protilátkou, která je cílená vazbou na stanovované proteiny. Poté se membrána několikrát promyje a inkubuje v pufru se sekundární protilátkou, která cílí na použitou primární protilátku a je značená, například enzymem křenová peroxidasa (HRP) či alkalická fosfatasa (AP). Po opětovném promytí membrány se přidá substrát pro sekundární protilátku, pro HRP je to roztok luminolu, pro AP roztok NBT/BCIP (nitrotetrazoliová modř/bromo-chloro-indolyl fostát). Výsledný signál může být dále snímán pomocí detekčního přístroje specializovaného pro imunoblotting (Ni et al., 2017).

Detekci karbonylovaných proteinů po jejich derivatizaci s DNPH imunochemickou metodou Western blot lze provést dvěma způsoby lišícími se v kroku derivatizace proteinů s DNPH. V prvním případě se ke vzorkům obsahujícím karbonylované proteiny přidává roztok SDS a DNPH v trifluoroctové kyselině. Společně se inkubují při pokojové teplotě 10-30 minut a poté se směs neutralizuje. Je důležité nenechat reagovat směs delší dobu, protože by mohlo dojít k nežádoucím interakcím DNPH i s neoxidovanými částmi proteinů. Poté se směs proteinů elektroforeticky separuje SDS-PAGE, následuje přenos na PVDF nebo nitroceluloseovou membránu. Membrána se blokuje, poté se inkubuje s primární anti-DNP protilátkou, která cílí na 2,4-dinitrofenylhydrazon, tedy produkt derivatizace DNPH s karbonylovaným proteinem, a několikrát promyje. Promytá membrána se inkubuje se sekundární značenou protilátkou cílicí vazbou na použitou primární protilátku. Po přidání substrátu pro enzymově značenou sekundární protilátku se analyzuje signál (Obr.21) (Wehr & Levine, 2013; Colombo et al., 2016).



Obrázek 21: Metoda Western blot pro určení rozsahu karbonylace proteinů spočívá v derivatizaci proteinů s DNPH a SDS, následné elektroforetické separaci DNP derivátů proteinů SDS-PAGE, přenesení separovaných proteinů na membránu a imunodetekci s primární anti-DNP protilátkou a sekundární značenou protilátkou. Značení umožňuje detekci DNP derivátů proteinů. Převzato z: (Wehr & Levine, 2013). Vytvořeno v ChemSketch.

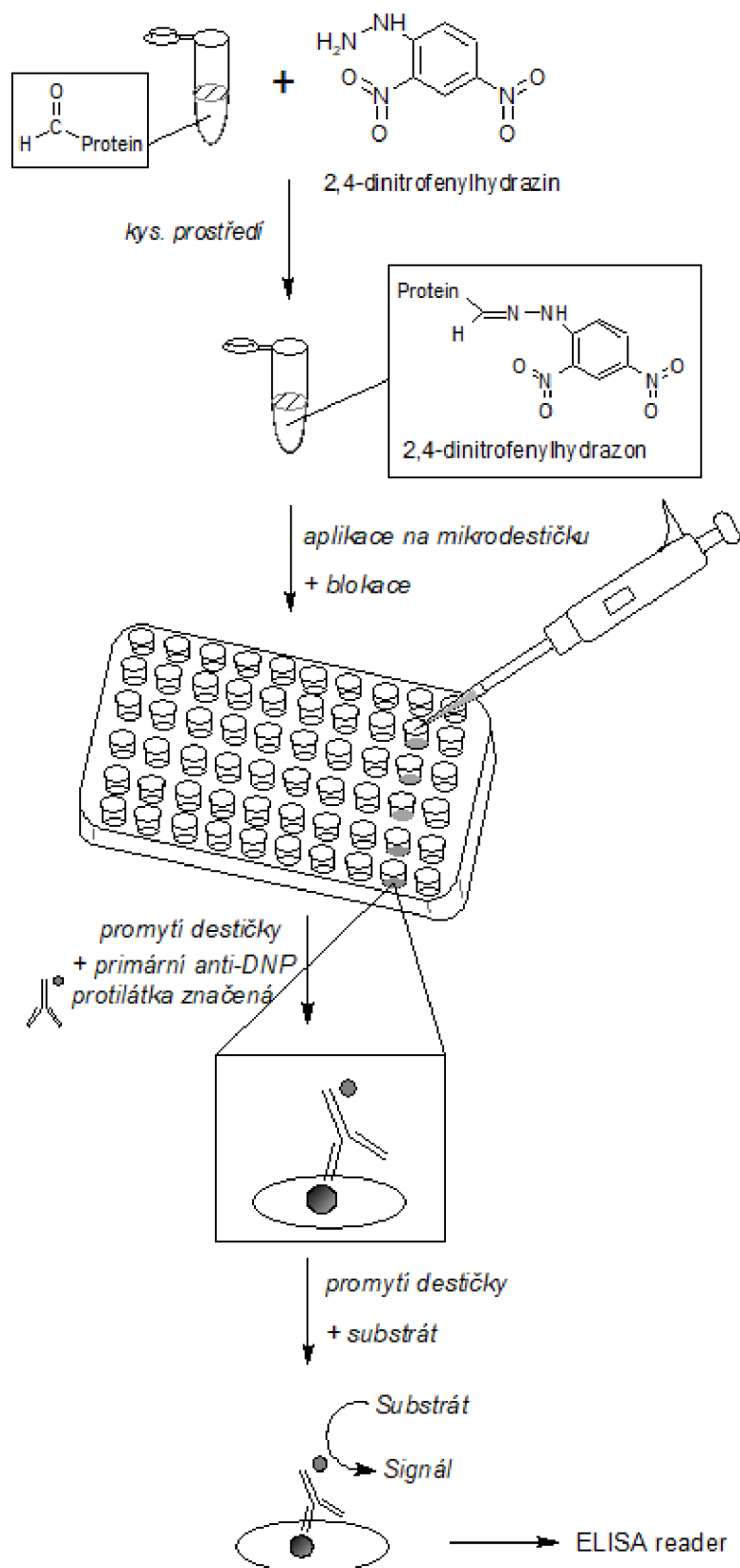
Druhý způsob zahrnuje derivatizaci DNPH s karbonylovanými proteiny až po jejich separaci SDS-PAGE a přenosu na membránu. V tomto případě se používá PVDF membrána, protože nitrocelulosa může být poškozena při interakci se silnou kyselinou, která je použita pro reakci DNPH s proteiny ve vzorcích. Dále následuje standardní postup vedoucí k detekci cílových proteinů (Dalle-Donne et al., 2003).

Western blot je citlivá kvalitativní metoda, u které díky rozdělení proteinů podle molekulové hmotnosti lze určit míru karbonylace jednotlivých proteinů nebo sekce proteinů o podobné velikosti. Pro stanovení je ve vzorku potřeba okolo 20-50 µg proteinů (Dalle-Donne et al., 2003).

2.6.2.2 Stanovení karbonylovaných proteinů metodou ELISA

Imunochemické stanovení karbonylovaných proteinů metodou ELISA s využitím 2,4-dinitrofenylhydrazinu je založeno na detekci DNP derivátů proteinů provedením přímé nebo nepřímé ELISA metody (Alamdari et al., 2005; Colombo et al., 2016).

Vzorky s obsahem karbonylovaných proteinů se ponechají reagovat s DNPH v kyselém prostředí. Vzniklé DNP deriváty proteinů se poté pipetují do jamek ELISA destičky pro jejich navázání (Obr. 22). Nebílkovinné složky a nezreagované DNPH se vymyjí promývacím pufrům. Po promývacích krocích se destička blokuje blokovacím pufrům, aby nedocházelo k nespecifickým vazbám protilátek. Při přímé ELISA metodě se jamky blokové destičky inkubují s primární anti-DNP protilátkou s navázanou značkou, nejčastěji enzym AP či HRP. Po uplynutí doby inkubace se destička několikrát promyje, poté se přidá substrát pro enzymovou značku, který je přeměněn na barevný produkt odpovídající koncentraci karbonylovaných proteinů, a změří se absorbance vzorků při vlnové délce absorpčního maxima barevného produktu. Ke stanovení karbonylovaných proteinů derivatizovaných s DNPH lze také použít nepřímou ELISA metodu, kdy se po blokaci destičky pipetuje do jamek primární anti-DNP protilátka. Po inkubaci a promývacích krocích se do jamek pipetuje sekundární značená protilátka cílená proti použité primární protilátce a ponechá se inkubovat. Po promytí se do jamek přidá substrát pro enzymovou značku sekundární protilátky, který je přeměněn na barevný produkt a změří se jeho absorbance (Dalle-Donne et al., 2003; Alamdari et al., 2005; Augustyniak et al., 2015).



Obrázek 22: Stanovení karbonylace proteinů derivatizací s DNPH přímou ELISA metodou je založeno na reakci karbonylovaných proteinů s DNPH v kyselém prostředí za vzniku DNP derivátů proteinů, které se naváží do jamek mikrodestičky. Mikrodestička se poté blokuje, aby nedocházelo k nespecifickým vazbám protilátek. Následně se do jamek přidá primární anti-DNP značená protilátka a po přidání substrátu se ELISA readerem změří absorbance. Převzato z: (Alamdari et al., 2005), vytvořeno pomocí ChemSketch.

Pro kvantitativní vyhodnocení se využije výpočtu na základě kalibrační křivky standardu, přesněji různě oxidovaného BSA. Vyrůstající oxidace BSA je připravena smícháním oxidovaného a neoxidovaného BSA v určitém poměru ve fosfátovém pufru (PBS). BSA se nechá reagovat s DNPH a inkubuje v mikrodestičce, každá následující jamka má vyšší koncentraci oxidovaného BSA. Výsledná absorbance oxidovaného BSA po derivatizaci s DNPH se využije pro vytvoření kalibrační křivky, která slouží k vypočtení koncentrace karbonylovaných proteinů ve vzorcích (Dalle-Donne et al., 2003; Alamdari et al., 2005).

Metoda ELISA má vysokou senzitivitu, protože pro stanovení stačí i malé množství karbonylovaných proteinů ve vzorku v řádu μg (Dalle-Donne et al., 2003).

2.6.3 Hmotnostní spektrometrické stanovení karbonylace proteinů

Hmotnostní spektrometrie (MS) je analytická metoda, která je založena na stanovení podílu hmotnosti ku náboji částice (m/z) s velmi vysokou senzitivitou (Mann et al., 2001). Analýza probíhá v plynné fázi v hmotnostním spektrometru, který se skládá ze zdroje ionizace, hmotnostního analyzátoru a detektoru (Glish & Vachet, 2003). K přechodu molekul ze vzorku do plynné fáze se využívá ionizačních technik jako je ionizace elektrosprejem (ESI) nebo laserová desorpční ionizace s pomocí matrice (MALDI). Hmotnostních analyzátorů je několik druhů a slouží pro urychlení či separaci ionizovaných částic v elektrickém nebo magnetickém poli, například kvadrupólový analyzátor (Q), lineární TOF (time-of-flight) analyzátor či iontová past. Detektor zaznamenává dopad nabitých částic a m/z . Při znalosti náboje lze z m/z určit molekulovou hmotnost částice (Mann et al., 2001; Glish & Vachet, 2003). Pro strukturní analýzu biomolekul se využívá tzv. tandemové hmotnostní spektrometrie (MS/MS), která využívá spektrometrů kombinovaných z více analyzátorů a zdroje ionizace, například MALDI TOF/TOF, MALDI-q-TOF a ESI-Q-q-TOF (Mann et al., 2001). Kromě MS/MS se ke spektrometrické analýze biomolekul také využívá separace analyzované směsi, například pomocí kapalinové chromatografie, která je následována hmotnostní spektrometrií (LC-MS) (Mann et al., 2001; Glish & Vachet, 2003).

MS stanovení karbonylovaných proteinů je založeno na derivatizaci karbonylovaných proteinů s DNPH za vzniku DNP derivátů proteinů, které je následováno LC-MS/MS. Například HPLC-ESI-MS/MS, kdy se z hmotnostního spektra na základě intenzity píků

analyzovaných proteinů odečtou jejich hmotnostní změny po navázání DNPH (Zwiener et al., 2002).

MS analýza je vhodnou metodou pro detekci posttranslačně modifikovaných proteinů, protože MS analýza umožňuje změřit rozdíl v molekulové hmotnosti modifikovaného a původního proteinu (Mann et al., 2001).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál a přístroje

3.1.1 Chemikálie

Coomassie Brilliant Blue G250 (Bio-Rad, USA)

Dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4 , Lach-Ner, Česká republika)

Dithiothreitol (DTT, Sigma-Aldrich, Německo)

Ethanol (Lach-Ner, Česká republika)

Ethylacetát (Sigma-Aldrich, Německo)

Ethylendiamintetraacetát tetrasodný dihydrát (EDTA, EMD Millipore, USA)

Guanidium hydrochlorid (GuHCl , AppliChem, Německo)

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

Hydrogenfosforečnan draselný (K_2HPO_4 , Lach-Ner, Česká republika)

Hydroxid sodný (NaOH , Lach-Ner, Česká republika)

Chlorid železnatý tetrahydrát (FeCl_2 , Aeros organics, Belgium)

Inhibitor proteas P9599 (Protease inhibitor cocktail, Sigma-Aldrich, Německo)

Kyselina chlorovodíková (Lach-Ner, Česká republika)

Peroxid vodíku 30% roztok (H_2O_2 , Lach-Ner, Česká republika)

Trifluoroctová kyselina (TFA, Sigma-Aldrich, Německo)

Trichloroctová kyselina (TCA, Lach-Ner, Česká republika)

Triton X-100 (Serva, Německo)

2,4-dinitrofenylhydrazin (Sigma-Aldrich, Německo)

3.1.2 Biologický materiál

Pro optimalizaci protokolu pro stanovení koncentrace karbonylovaných proteinů Levinovou metodou byly použity dělnice *A. mellifera*, které byly vylíhnuty v rámci uchovávaném při 34 °C a sbírány do laboratorních klíček po 100 včelách, ve kterých byly následně znovu umístěny do inkubátoru s teplotou 34 °C. Po týdnu byly včely z klíček odebrány a zamrazeny v tekutém dusíku a následně skladovány při -80 °C.

Pro stanovení karbonylovaných proteinů u včel, které byly vystaveny stresovým podmínkám, byly použity dělnice ošetřené paraquatem. Včely, které byly rovněž vylíhnuty za laboratorních podmínek, jak je uvedeno výše, byly po týdnu od jejich

vylíhnutí rozděleny do tří skupin, z nichž byla jedna skupina imunizována roztokem paraquat (1 μl o c = 1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) v PBS (pro přípravu 1 l pufru o pH = 7.4 bylo rozpuštěno 8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,44 g Na_2HPO_4 a 0,24 g KH_2PO_4 v destilované vodě), druhá skupina byla imunizována stejným objemem PBS, třetí skupina sloužila jako kontrolní – bez vpichu jakékoliv látky. Všechny skupiny včel byly před imunizací na 90 sekund uspány CO_2 s následnou sterilizací zadečku 96% EtOH. Teprve poté následovalo injektování příslušné látky (paraquat/PBS) – s výjimkou kontrolní skupiny včel. Po imunizaci byly včely vráceny do klíček a v časových intervalech 0, 4 a 8 hodin byl zamražen alikvot daných včel v tekutém dusíku a uskladněn při $-80\text{ }^\circ\text{C}$ pro následující práci. Veškerý biologický materiál byl poskytnut vedoucí bakalářské práce.

3.1.3 Instrumentace a pomůcky

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

Automatické pipety (Eppendorf, Německo)

Centrifuga 5418 R (Eppendorf, Německo)

Kapalný dusík TP35 (Air Liquide, Francie)

Laboratorní pH-metr pH 50+ DHS (Dostmann, Německo)

Laboratorní váha PS 210.R2 (Radwag, Polsko)

Magnetická míchačka Intelli-Stirrer MSH-300i (Biosan, Litva)

Spektrofotometr Power Wave XS (Biotek, USA)

Thermo-shaker TS-100C (Biosan, Litva)

Ultrazvuk K-5LM (Kraintek, Slovensko)

Vortex V-1 Plus (Biosan, Litva)

Výrobník ledu AF 80 (Scotsman, USA)

3.1 Metody

3.1.1 Stanovení koncentrace celkových proteinů metodou dle Bradforda

3.1.1.1 Příprava roztoků

Zásobní roztok Bradfordova činidla (roztok Coomassie Blue):

V 25 ml methanolu a 50 ml 85% roztoku kyseliny fosforečné bylo rozpuštěno 50 mg Coomassie Brilliant Blue G-250. Tento roztok byl doplněn destilovanou vodou (ddH₂O) do výsledného objemu 100 ml. Takto připravený zásobní roztok byl uchován v lednici při 4 °C.

Pracovní roztok Bradfordova činidla:

Požadovaný objem pracovního roztoku Bradfordova činidla byl připraven zředěním zásobního roztoku Bradfordova činidla ddH₂O v poměru 1:4. Pracovní roztok byl vždy připraven čerstvý před měřením.

Standardy BSA:

Byl připraven zásobní roztok BSA o koncentraci 10 mg·ml⁻¹ rozpuštěním 10 mg BSA v 1 ml ddH₂O. Standardy BSA o vzrůstající koncentraci byly připraveny naředěním ze zásobního roztoku BSA podle Tab. 2.

Tabulka 2: Objemy zásobního roztoku BSA o koncentraci 10 mg·ml⁻¹ a destilované vody pro přípravu standardů BSA

c_{BSA} [mg·ml ⁻¹]	V_{ZR} * [μl]	V_{ddH_2O} [μl]
0,05	5	995
0,10	10	990
0,20	20	980
0,40	40	960
0,60	60	940
0,80	80	920
1,00	100	900

* zásobní roztok BSA

3.1.1.2 Stanovení kalibrační křivky

Pro stanovení kalibrační křivky BSA bylo využito mikrodestičkové uspořádání. Do jednotlivých jamek destičky byly pipetovány vzorky standardu BSA a blank, vždy v triplicátu. Do každé jamky bylo odděleně napipetováno 5 μl standardu BSA o vzrůstající koncentraci 0,05 mg·ml⁻¹ až 1,00 mg·ml⁻¹, 45 μl ddH₂O a 200 μl pracovního roztoku Bradfordova činidla. Jako blank sloužilo 50 μl ddH₂O a 200 μl pracovního roztoku Bradfordova činidla. Obsah jamek byl ponechán 5 minut inkubovat a poté byla proměřena absorbance při 595 nm na mikrodestičkovém readeru Power Wave XS (Biotek). V programu Excel byla sestavena kalibrační křivka BSA.

3.1.2 Oxidace hovězího sérového albuminu

3.1.2.1 Příprava roztoků

100 mmol·l⁻¹ roztoky KH₂PO₄ a K₂HPO₄:

Roztok K₂HPO₄ o koncentraci 100 mmol·l⁻¹ byl připraven rozpuštěním 8,709 g K₂HPO₄ v 50 ml ddH₂O. Roztok KH₂PO₄ o koncentraci 100 mmol·l⁻¹ byl připraven rozpuštěním 6,804 g KH₂PO₄ v 50 ml ddH₂O. Připravené roztoky K₂HPO₄ a KH₂PO₄ byly uschovány v lednici při 4 °C.

10 mmol·l⁻¹ fosfátový pufr, pH 7,4:

Pro přípravu 10 mmol·l⁻¹ fosfátového pufru bylo smícháno 0,802 ml 100 mmol·l⁻¹ roztoku K₂HPO₄, 0,198 ml 100 mmol·l⁻¹ roztoku KH₂PO₄ a 6 ml ddH₂O. Následně bylo upraveno pH pomocí HCl a roztok byl doplněn do 10 ml ddH₂O a následně naředěn do výsledného objemu 100 ml ddH₂O o odpovídající koncentraci 10 mmol·l⁻¹. Pufr byl následně uchován pro další použití v lednici při 4 °C.

0,075 mmol·l⁻¹ roztok BSA:

Pro přípravu 0,075 roztoku mmol·l⁻¹ BSA bylo naváženo 24,975 mg BSA. Navážka byla rozpuštěna v 5 ml 10 mmol·l⁻¹ fosfátového pufru.

0,375 mmol·l⁻¹ a 1,875 mmol·l⁻¹ roztok chloridu železnatého:

Zásobní roztok FeCl₂ o koncentraci 10 mmol·l⁻¹ byl připraven rozpuštěním 19,88 mg FeCl₂ v 10 ml 10 mmol·l⁻¹ fosfátového pufru. Roztok byl následně uschován v lednici při 4 °C pro další použití. Roztok FeCl₂ o koncentraci 0,375 mmol·l⁻¹ byl připraven smísením 37,5 µl zásobního roztoku FeCl₂ s 962,5 µl 10 mmol·l⁻¹ fosfátového pufru. Roztok FeCl₂ o koncentraci 1,875 mmol·l⁻¹ byl připraven smísením 187,5 µl zásobního roztoku FeCl₂ s 812,5 µl 10 mmol·l⁻¹ fosfátového pufru.

0,375 mmol·l⁻¹ a 1,875 mmol·l⁻¹ roztok EDTA:

Zásobní roztok EDTA o koncentraci 10 mmol·l⁻¹ byl připraven rozpuštěním 37,22 mg EDTA v 10 ml 10 mmol·l⁻¹ fosfátového pufru. Roztok byl následně uchován pro další použití v lednici při 4 °C. Roztok EDTA o koncentraci 0,375 mmol·l⁻¹ byl připraven smísením 37,5 µl zásobního roztoku EDTA s 962,5 µl 10 mmol·l⁻¹ fosfátového pufru. Roztok EDTA o koncentraci 1,875 mmol·l⁻¹ byl připraven smísením 187,5 µl zásobního roztoku EDTA s 812,5 µl 10 mmol·l⁻¹ fosfátového pufru.

1,5 mmol·l⁻¹ a 7,5 mmol·l⁻¹ roztok peroxidu vodíku:

Zásobní roztok H₂O₂ o koncentraci 100 mmol·l⁻¹ byl připraven smísením 11,6 µl 30% roztoku H₂O₂ o koncentraci 8625,5 mmol·l⁻¹ s 988,4 µl 10 mmol·l⁻¹ fosfátového pufru.

Roztok H_2O_2 o koncentraci $1,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ byl připraven smísením $15 \mu\text{l}$ zásobního roztoku H_2O_2 s $985 \mu\text{l}$ $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosfátového pufru. Roztok H_2O_2 o koncentraci $1,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ byl připraven smísením $75 \mu\text{l}$ zásobního roztoku H_2O_2 s $925 \mu\text{l}$ $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosfátového pufru.

2% roztok trifluoroctové kyseliny:

Dvouprocentní roztok TFA byl připraven smísením $0,2 \text{ ml}$ 100% TFA a $9,8 \text{ ml}$ dd H_2O . Roztok byl následně uschován v lednici při $4 \text{ }^\circ\text{C}$ pro další použití.

3.1.2.2 Oxidace BSA

Oxidace BSA byla provedena za dvojích oxidačních podmínek, které byly označeny jako Ox2 a Ox10. Mírnější podmínky oxidace (Ox2) odpovídaly obsahu složek reakční směsi o výsledné koncentraci $0,05 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ BSA, $0,05 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ FeCl_2 , $0,05 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA a $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ H_2O_2 . Silnější podmínky oxidace (Ox10) odpovídaly obsahu složek reakční směsi o výsledné koncentraci $0,05 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ BSA, $0,25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ FeCl_2 , $0,25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA a $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ H_2O_2 .

Do 2 ml mikrozkušavek bylo napipetováno pro podmínky Ox2 $1000 \mu\text{l}$ $0,075 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ BSA, $200 \mu\text{l}$ $0,375 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ FeCl_2 , $200 \mu\text{l}$ $0,375 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA a $100 \mu\text{l}$ $1,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ H_2O_2 . Pro podmínky Ox10 bylo do 2 ml mikrozkušavek napipetováno $1000 \mu\text{l}$ $0,075 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ BSA, $200 \mu\text{l}$ $1,875 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ FeCl_2 , $200 \mu\text{l}$ $1,875 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA a $100 \mu\text{l}$ $7,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ H_2O_2 . Dále byly vytvořeny dvě kontrolní mikrozkušavky s obsahem $1000 \mu\text{l}$ $0,075 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ BSA a $750 \mu\text{l}$ $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosfátového pufru, v nichž oxidace BSA neprobíhala a sloužily jako kontrola.

Mikrozkušavky byly ponechány 6 h v třepačce při $37 \text{ }^\circ\text{C}$ a 300 rpm . Po 6 h inkubaci byl oxidační proces ukončen okyselením, tedy přidáním $250 \mu\text{l}$ 2% trifluoroctové kyseliny do mikrozkušavek s reakční směsí. Všechny mikrozkušavky byly následně zmrazeny v kapalném dusíku a uchovány v mrazáku při $-30 \text{ }^\circ\text{C}$.

Pro finální sestavení kalibrační křivky karbonylovaného BSA byla zvolena oxidace BSA za podmínek Ox10 s inkubací 6 h při $37 \text{ }^\circ\text{C}$ a bez kontinuálního třepání.

3.1.3 Levinova metoda pro stanovení karbonylovaného BSA a sestavení kalibrační křivky karbonylovaného BSA

3.1.3.1 Příprava roztoků

10 mmol·l⁻¹ fosfátový pufr, pH 7,4

50 mmol·l⁻¹ fosfátový pufr, pH 7,4:

Pro přípravu 50 mmol·l⁻¹ fosfátového pufru bylo smícháno 8,02 ml 100 mmol·l⁻¹ roztoku K₂HPO₄, 1,98 ml 100 mmol·l⁻¹ roztoku KH₂PO₄ a 80 ml ddH₂O. Následně bylo upraveno pH pomocí HCl a roztok byl doplněn do 100 ml ddH₂O a následně naředěn do výsledného objemu 200 ml ddH₂O o odpovídající koncentraci 50 mmol·l⁻¹. Pufr byl následně uschován pro další použití v lednici při 4 °C.

2 mol·l⁻¹ roztok kyseliny chlorovodíkové:

Roztok HCl o koncentraci 2 mol·l⁻¹ byl připraven smísením 17,7 ml 36% HCl s 82,3 ml ddH₂O. Roztok byl následně uchován pro další použití v lednici při 4 °C.

10 mmol·l⁻¹ roztok DNPH:

Roztok DNPH o koncentraci 10 mmol·l⁻¹ byl připraven rozpuštěním vypočtené navážky DNPH (Mr = 198,14), vztahující se na objem potřebného roztoku, v 2 mol·l⁻¹ roztoku HCl. Pro přípravu 1 ml roztoku bylo naváženo 1,98 mg DNPH a navážka byla rozpuštěna v 1 ml 2 mol·l⁻¹ roztoku HCl. Rozpuštění proběhlo za použití ultrazvukové lázně a třepačky nastavené na 37 °C a 250 rpm. Roztok DNPH byl připraven čerstvě vždy před provedením Levinovy metody a byl chráněn před světlem.

20% roztok trichloroctové kyseliny:

Dvacetiprocentní roztok TCA byl připraven smísením 20 ml 100% roztoku TCA s 980 ml ddH₂O. Roztok byl následně uschován v lednici při 4 °C pro další použití.

Roztok ethanol/ethylacetát:

Roztok ethanol/ethylacetát v poměru 1:1 byl připraven smísením 50 ml 96% roztoku ethanolu s 50 ml roztoku ethylacetátu. Roztok byl následně uchován pro další použití v lednici při 4 °C.

6 mol·l⁻¹ roztok guanidium hydrochloridu:

Pro přípravu 6 mol·l⁻¹ roztoku guanidium hydrochloridu (GuHCl) bylo rozpuštěno 28,66 g GuHCl v 25 ml ddH₂O. Rozpuštění probíhalo na magnetické míchačce za teploty 40 °C, následně byl roztok doplněn na výsledný objem 50 ml ddH₂O. Roztok byl následně uschován v lednici při 4 °C.

3.1.3.2 Stanovení karbonylovaného BSA Levinovou metodou

Ve vzorcích oxidovaného BSA byla nejprve Bradfordovou metodou stanovena koncentrace celkových proteinů. V rámci optimalizace byla Levinova metoda provedena ve dvou variantách. První varianta (V1) vzorků obsahovala 40 μg proteinu, druhá varianta (V2) vzorků obsahovala 500 μg proteinu. Varianty byly připraveny v duplikátu pro Ox2, Ox10 a neoxidované BSA.

Ke vzorkům byl přidán 10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztok DNPH v 2 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ HCl a v případě blanku byl roztok DNPH v 2 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ HCl nahrazen 2 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ HCl. Vzorky a blanky byly ponechány inkubovat po dobu 1 h v třepačce při 25 °C a 400 rpm za podmínek tmy. Po ukončení inkubace bylo do všech mikrozkušavek přidáno 160 μl 20% roztoku TCA pro precipitaci proteinů, mikrozkušavky byly dány na 10 min na led, opět za podmínek tmy. Poté byla provedena pětiminutová centrifugace v centrifuze vychlazené na 4 °C a při 11 000 \times g. Po zcentrifugování byl opatrně odpipetován supernatant a pelet byl promyt přidáním 160 μl směsi ethanol/ethylacetát. Mikrozkušavky byly důkladně promíchány na vortexu a ponechány 10 min třepat při 25 °C a 250 rpm za podmínek tmy. Následně byla provedena pětiminutová centrifugace při 25 °C a 11 000 \times g. Poté byl opět opatrně odpipetován supernatant a postup pomývání byl zopakován ještě dvakrát. Nakonec byl pelet rozpuštěn přidáním 500 μl roztoku guanidinium hydrochloridu a desetiminutovým třepáním při 37 °C a 300 rpm.

Poté bylo pipetováno po 200 μl daných vzorků v duplikátech do jamek mikrodestičky a proměřeno absorpční spektrum v rozmezí 310-500 nm. Po kontrole absorpčního maxima byla při jeho vlnové délce, odpovídající 360 nm, změřena absorbance vzorků.

3.1.3.3 Sestavení kalibrační křivky karbonyl-BSA

Pro sestavení kalibrační křivky bylo použito karbonylované BSA za podmínek oxidace Ox10. Po stanovení koncentrace proteinů Bradfordovou metodou bylo karbonylované BSA z jednotlivých mikrozkušavek naředěno 50 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosfátovým pufrům na zásobní roztok o koncentraci proteinu 1,500 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Standardy karbonylovaného BSA o koncentracích 0,100; 0,250; 0,500; 0,750; 1,000; 1,250 a 1,500 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ byly připraveny podle Tab. 3 naředěním zásobního roztoku 50 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosfátovým pufrům na výsledný objem 640 μl . Každý standard o dané koncentraci byl připraven v triplikátu.

Tabulka 3: Objemy zásobního roztoku karbonylovaného BSA o koncentraci 1,500 mg·ml⁻¹ a 50 mmol·l⁻¹ fosfátového pufru pro přípravu standardů karbonylovaného BSA.

$C_{\text{karbonyl-BSA}} [\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}]$	$V_{\text{ZR } 1500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}}^* [\mu\text{l}]$	$V_{50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ PBS}}^\dagger [\mu\text{l}]$
0,100	42,6	597,4
0,250	106,6	533,4
0,500	213,3	426,7
0,750	320,0	320,0
1,000	426,6	213,4
1,250	533,4	106,6
1,500	640,0	–

* zásobní roztok karbonylovaného BSA o koncentraci 1,500 mg·ml⁻¹

† fosfátový pufr o koncentraci 50 mmol·l⁻¹

Ke každému vzorku bylo přidáno 160 μl 10 mmol·l⁻¹ roztok DNPH v 2 mol·l⁻¹ HCl a ke každému blanku totožný objem 2 mol·l⁻¹ HCl. Následující postup byl totožný s výše uvedeným postupem (kap. 3.1.3.2).

Pro standardy karbonylovaného BSA (karbonyl-BSA) byla změřena absorbance při 360 nm a sestavena kalibrační křivka.

3.1.4 Příprava extraktů včel

3.1.4.1 Příprava roztoků

Extrakční pufr:

Pufr pro extrakci proteinů ze včelích vzorků obsahuje 50 mmol·l⁻¹ fosfátový pufr, 1% roztok dithiotreitolu a inhibitoru proteas (Protease inhibitor cocktail; 1 ml/100 ml pufru). Extrakční pufr byl připraven před extrakcí vždy čerstvý.

3.1.4.2 Příprava včel

Zamražené včely se nechaly povolit a manikúrními nůžkami byla včelám oddělena hlava. Pinzetou byl uchopením posledního článku zadečku vypreparován trávicí trakt (výkalový váček, tenké střevo a žaludek) včetně medného volátka. Včely (celé nebo jednotlivé tělní části) byly umístěny do předem zvážené 2ml mikrozkušavky, byly zváženy a zmrazeny v kapalném dusíku.

3.1.4.3 Příprava včelích extraktů

Extrakce proteinů ze včelích vzorků byla provedena v poměru 1:4 (w/v). Preparované včely byly z mikroskopavky přesunuty do třecí misky. Do třecí misky bylo nalito menší množství kapalného dusíku a pomocí tloučku byl biologický materiál zhomogenizován. Poté bylo přidáno odpovídající množství extrakčního pufru, biologický materiál byl důkladně v extrakčním pufru rozmělněn a následně přenesen do mikroskopavky.

Takto připravené včelí extrakty byly ponechány na ledu po dobu 20 min za občasného promíchání na vortexu. Poté byly mikroskopavky 20 min centrifugovány při 4 °C a 16 000× g. Po centrifugaci byl přepipetován supernatant do čistých mikroskopavek a pro další práci chlazeny na ledu.

Pro provedení Levinovy metody byly včelí vzorky naředěny na 1 mg·ml⁻¹ v 50 mmol·l⁻¹ fosfátovém pufru na výsledný objem 640 μl.

3.1.5 Levinova metoda pro stanovení karbonylovaných proteinů ve včelích vzorcích

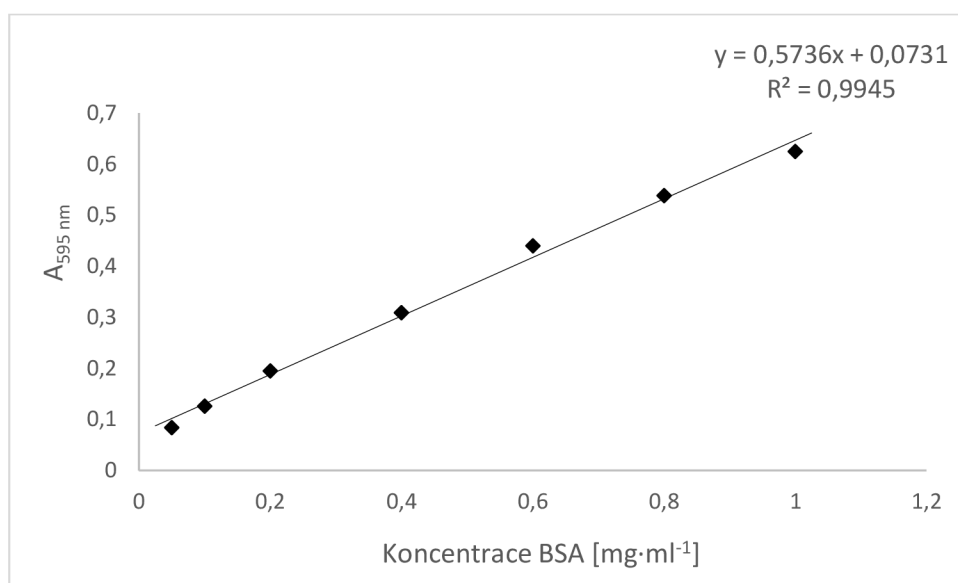
3.1.5.1 Stanovení karbonylovaných proteinů Levinovou metodou

Pro každý vzorek byl připraven duplikát sloužící jako jeho blank. Ke vzorku i blanku bylo přidáno 160 μl odpovídajícího činidla a následující postup byl téměř totožný s postupem stanovení karbonylovaného BSA (viz kap. 3.1.3.2). Rozdíl oproti uvedenému postupu spočíval v odlišné délce trvání rozpuštění peletu, které trvalo 30 min za třepání při 37 °C a 350 rpm.

4 DISKUZE A VÝSLEDKY

4.1 Stanovení koncentrace celkových proteinů metodou dle Bradforda

Pro stanovení koncentrace celkových proteinů Bradfordovou metodou ve vzorcích byla nejprve sestavena kalibrační křivka, přičemž jako standard byl použit hovězí sérový albumin (BSA) v koncentračním rozpětí $0,05 - 1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Obr. 23). Následně byla pro výpočet celkových proteinů ve vzorcích po provedení Bradfordovy metody využita rovnice kalibrační křivky BSA $y = 0,5736x + 0,0731$ s hodnotou spolehlivosti $R^2 = 0,9945$.

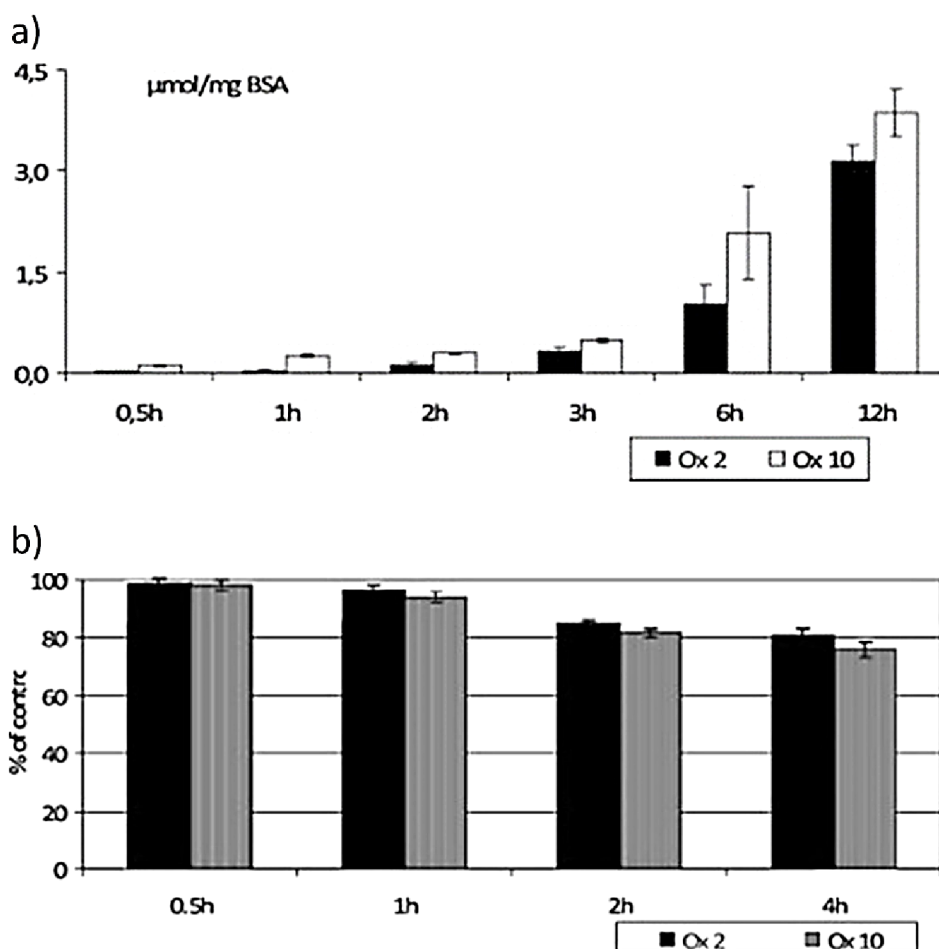


Obrázek 23: Kalibrační křivka BSA pro stanovení koncentrace celkových proteinů Bradfordovou metodou. Jako standard byl použit BSA v koncentracích $0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.

4.2 Oxidace hovězího sérového albuminu

Pro kontrolu zaváděné a optimalizované Levinovy metody pro stanovení karbonylovaných proteinů dle Colombo et al. (2016), bylo nejprve provedeno stanovení se standardem karbonylovaných proteinů. Tímto standardem je nejčastěji oxidované BSA (Mesquita et al., 2014). Oxidované BSA, neboli karbonylované BSA či karbonyl-BSA, je komerčně obtížně dostupné a cenově poměrně nákladné. Z tohoto důvodu bylo karbonylované BSA připraveno v laboratoři. Vycházelo se z postupu ve vědeckém článku Guedes et al. (2009). Oxidace BSA byla provedena za dvojích podmínek, a to mírnější (Ox2) a silnější oxidace (Ox10). Jelikož pro oxidaci BSA za daných podmínek není ověření, zda veškeré BSA v reakční směsi bylo zoxidováno, stanovená koncentrace

karbonylovaného BSA vychází pouze z předpokladu jeho kompletní oxidace. Pro oxidaci byla zvolena 6 h inkubace (Obr. 24 a), jelikož Guedes et al. (2009) uvádí, že během oxidačního procesu za delších časových intervalů inkubace dochází ke ztrátám BSA (Obr. 24 b). V rámci této bakalářské práce se během oxidace snížil obsah BSA ze 4,955 mg·ml⁻¹ na 1-2 mg·ml⁻¹ v jednotlivých připravených alikvotech. Tento pokles obsahu BSA byl pozorován i v případě kontrolního vzorku, tj. BSA nevystavené oxidačním činidlům.

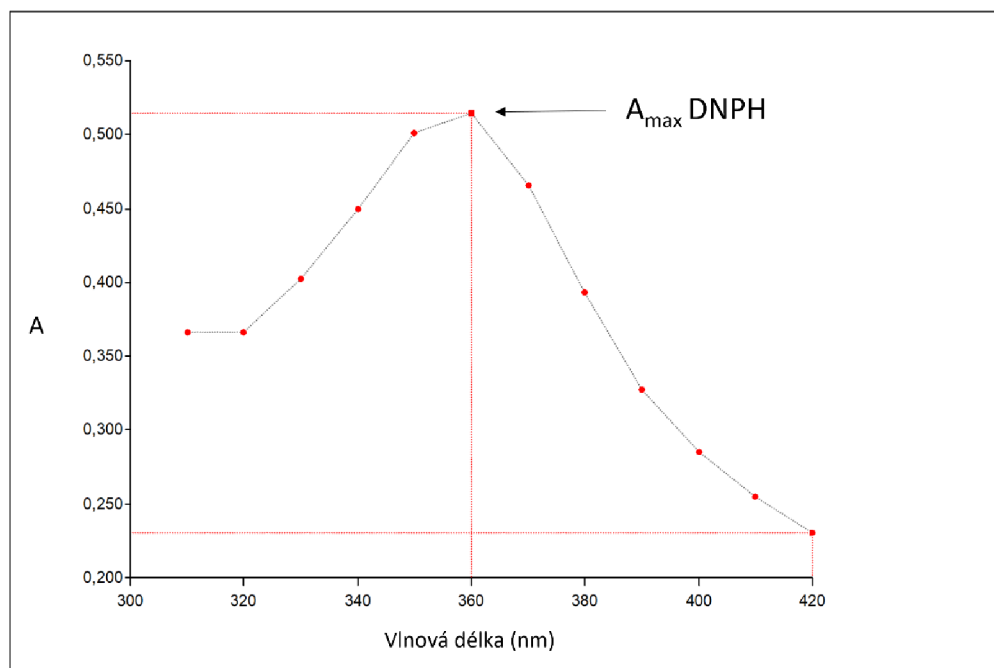


Obrázek 24: a) Obsah karbonylovaného BSA za dvou podmínek oxidace, a to mírnější (Ox2) a silnější oxidace (Ox10) v závislosti na době inkubace. b) Ztráty BSA při prodlužující se době inkubace s oxidačními činidly. Převzato z: (Guedes et al., 2009).

Pro sestavení kalibrační křivky karbonylovaného BSA byla nakonec provedena další oxidace BSA. Tato oxidace byla realizována bez třepání, jelikož třepání mohlo zapříčinit zvyšování ztráty BSA. Z původního obsahu 4,995 mg·ml⁻¹ BSA bylo po provedení oxidace v jednotlivých alikvotech okolo 2-3 mg·ml⁻¹ oxidovaného BSA.

4.3 Provedení Levinovy metody s karbonylovaným BSA

Při spektrofotometrickém stanovení karbonylovaných proteinů Levinovou metodou se vychází z měření absorbance při vlnové délce absorpčního maxima 2,4-dinitrofenylhydrazinu, proto bylo nejdříve proměřeno absorpční spektrum DNPH a zjištěno jeho absorpční maximum. Roztok DNPH v $2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ HCl má absorpční maximum při 360 nm (Obr. 25).

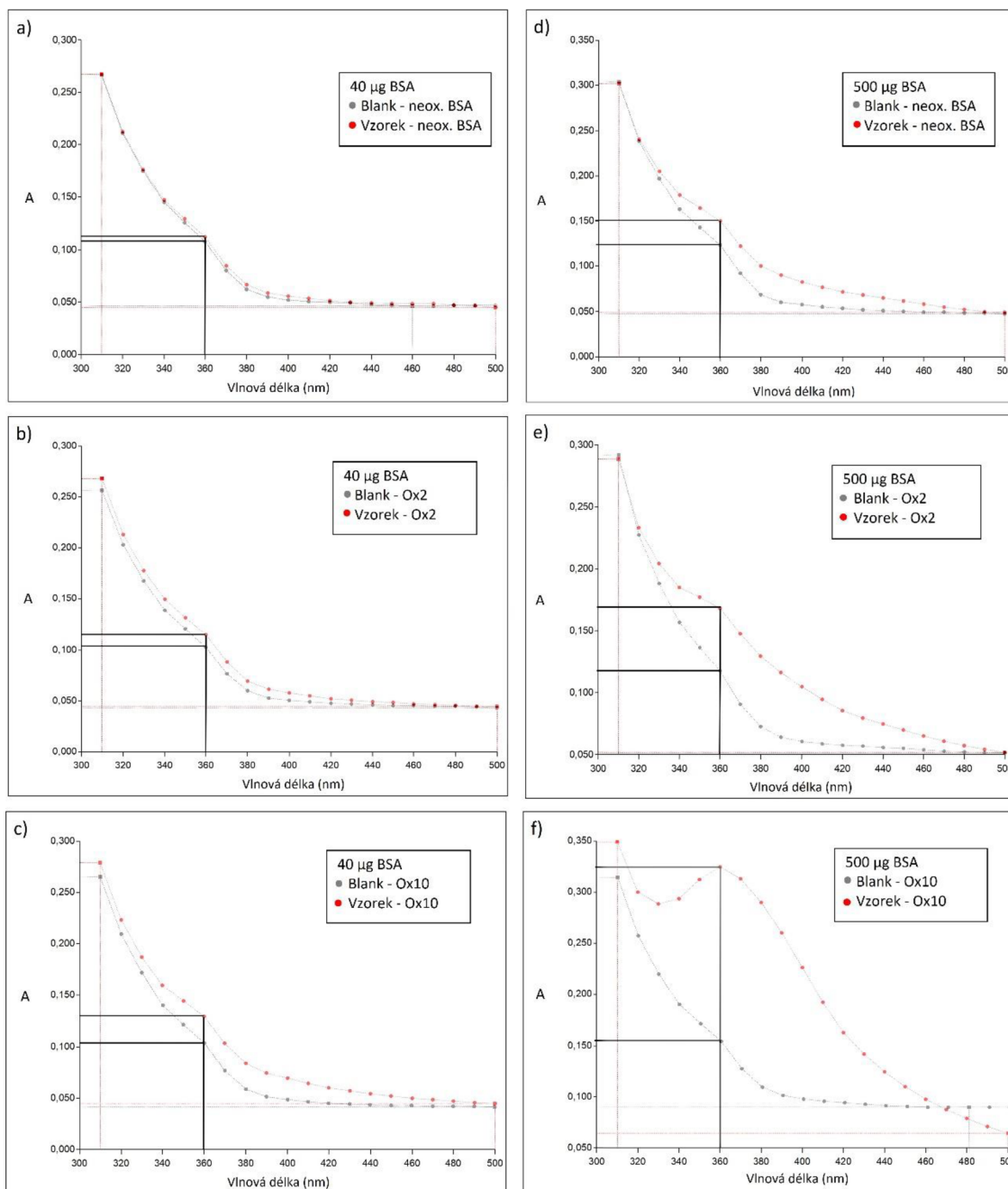


Obrázek 25: Absorpční spektrum $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku DNPH v $2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ HCl. Absorpční maximum odpovídá 360 nm.

Z neoxidovaného BSA, BSA Ox2 a BSA Ox10 byly připraveny dvě série vzorků. Každá série obsahovala různou koncentraci BSA a různé poměry DNPH vůči obsahu BSA, které byly použity se záměrem optimalizace podmínek a zjištění citlivosti Levinovy metody. Jedna série vzorků (V1) odpovídala obsahu $40 \mu\text{g}$ BSA a byla ponechána reagovat s $160 \mu\text{l}$ $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku DNPH (1:4, v/v). Druhá série vzorků (V2) odpovídala obsahu $500 \mu\text{g}$ BSA a byla ponechána reagovat s $80 \mu\text{l}$ $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku DNPH (6,25:1, v/v). Ke každému vzorku byl připraven blank (roztok DNPH nahrazen $2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ HCl) se stejným obsahem BSA.

Po provedení kroků inkubace vzorků s DNPH, precipitace proteinů, promývání peletu a rozpuštění peletu byla změřena absorpční spektra a poté absorbance vzorků a blanků při absorpčním maximu, které odpovídalo 360 nm. Absorpční spektra byla proměřena za

účelem zjištění, zda u vzorků karbonylovaných proteinů dochází oproti blanku ke změně jejich absorpčního spektra, kdy byl očekáván nárůst absorbance při 360 nm (Obr. 26). Ve vzorcích neoxidovaného BSA není očekávána přítomnost karbonylovaných proteinů, nemělo by tedy dojít k nárůstu absorbance po provedení Levinovy metody. Ve vzorku s obsahem 40 µg neoxidovaného BSA nebyl zaznamenán výrazný rozdíl mezi blankem a vzorkem (Obr. 26 a). V porovnání se vzorkem obsahujícím 500 µg neoxidovaného BSA je vidět mírný rozdíl, jelikož u tohoto vzorku je oproti blanku mírně zvýšena absorbance (Obr. 26 d). Toto pozorování by mohlo být v důsledku reakce DNPH s karboxylovou skupinou aminokyselin kyseliny asparagové a glutamové, které jsou součástí BSA.



Obrázek 26: Absorpční spektra vzorků karbonylovaného BSA a odpovídajícího blanku po provedení Levinovy metody s vyznačením absorpčního maxima DNP-karbonyl-BSA při 360 nm. Grafy a), b), c) odpovídají vzorkům s obsahem 40 µg BSA (neox. BSA a ox. BSA - Ox2 a Ox10) a grafy d), e), f) odpovídají vzorkům s obsahem 500 µg BSA (neox. BSA a ox. BSA - Ox2 a Ox10).

U vzorků s karbonylovaným BSA je patrné zvýšení absorbance oproti neoxidovanému BSA jak u série V1 (Obr. 26 b), c), tak u série V2 (Obr. 26 e), f). U vzorků s nižším obsahem karbonylovaného BSA, tedy 40 µg, není změna absorbance tak výrazná jako u vzorků s obsahem 500 µg karbonylovaného BSA, ale stále dochází ke zvýšení

absorbance oproti blanku. U vzorků se silnější podmínkou oxidace je absorbance vyšší oproti vzorkům s mírnější podmínkou oxidace, což odpovídá většímu množství zreagovaného DNPH a potvrzuje funkčnost Levinovy metody u oxidovaného BSA.

Z rozdílů absorbancí vzorků a blanků byla dosažením do vzorce (Rovnice 2) vypočtena koncentrace karbonylovaného BSA, ze které bylo vypočteno látkové množství karbonylu (Rovnice 3) a vztaženo na mg BSA (viz Tab. 4).

$$[PCO][mol \cdot l^{-1}] = \frac{A_{vz} - A_{bl}}{\epsilon_{360} \times 1 \text{ cm}}$$

Rovnice 2: Vzorec pro výpočet koncentrace karbonylovaného proteinu. A_{vz} odpovídá absorbanci vzorku, A_{bl} odpovídá absorbanci blanku a ϵ_{360} je molární absorpční koeficient při 360 nm a má hodnotu $22\,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Převzato z: (Mazurková, 2016).

$$n [\text{mol}] = c \times V$$

Rovnice 3: Vzorec pro výpočet látkového množství karbonylového obsahu, kdy c odpovídá koncentraci karbonylovaného proteinu $[\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}]$ a V odpovídá vstupnímu objemu vzorku $[\text{l}]$. Převzato z: (Mazurková, 2016).

Tabulka 4: Změřené absorbance při 360 nm po provedení Levinovy metody a vypočtené koncentrace karbonylovaného BSA v $\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$.

	A_{bl}	A_{vz}	$A_{vz} - A_{bl}$	$c^* [\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1}]$
40 μg BSA				
neox. BSA	0,106	0,110	0,004	0,182
Ox2	0,105	0,115	0,010	0,455
Ox10	0,104	0,127	0,023	1,045
500 μg BSA				
neox. BSA	0,119	0,145	0,026	1,182
Ox2	0,115	0,168	0,053	2,409
Ox10	0,123	0,318	0,195	8,864

*koncentrace karbonylovaného BSA v roztoku neox. a ox. BSA vypočtena ze vzorce (viz Rovnice 2 a 3)

Levinova metoda pro stanovení karbonylovaných proteinů u oxidovaného BSA byla provedena pouze v jednom opakování, vzhledem k tomu, že toto stanovení bylo prvotní a sloužilo ke zhodnocení vlivu podmínek oxidace na výsledný obsah karbonylu, a dále za

účelem, zda lze detekovat i menší množství karbonyl-BSA (V1) a k úpravě poměru činidlo/karbonyl-BSA.

Blanky vzorků mají absorpční v rozmezí 0,104-0,123, protože BSA má absorpční maximum okolo 280 nm (Topalá et al., 2014), proto má křivka absorpčního spektra v rozmezí 310-500 nm klesající tendenci a absorbance při 360 nm je vyšší než 0.

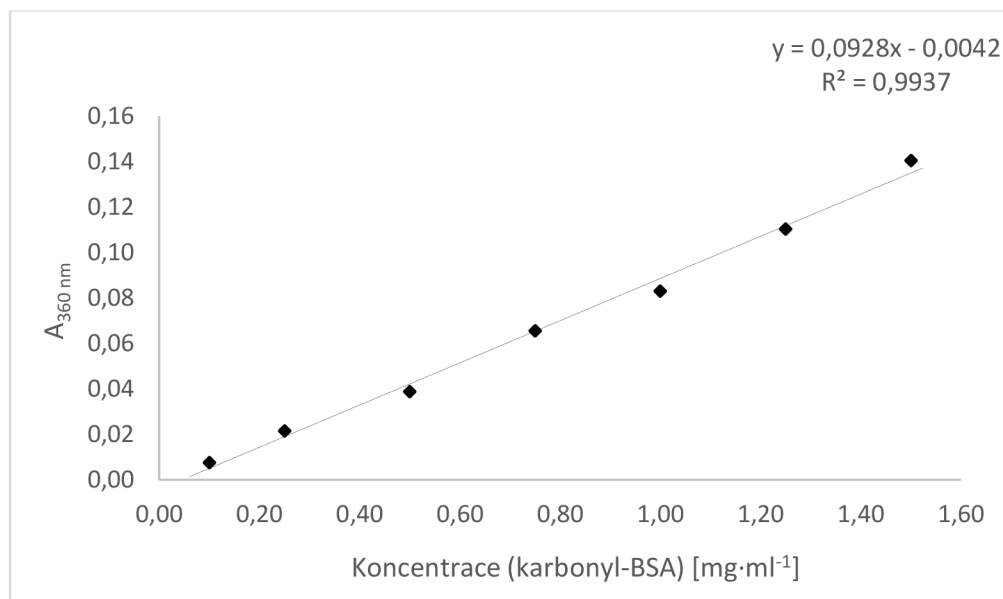
U vzorků neoxidovaného BSA, sloužícího jako negativní kontrola, vyšla nízká koncentrace karbonylovaného proteinu, což může být způsobeno reakcí DNPH s karboxylovou skupinou aminokyselin, které jsou součástí proteinu BSA, přesněji kyselin glutamové a asparagové, jak bylo zmíněno již dříve. U vzorků Ox10 byl stanoven vyšší obsah karbonylovaného BSA než u vzorků Ox2, což odpovídá podmínkám silnější oxidace u vzorků Ox10. Získané koncentrace karbonylovaných proteinů u vzorků ze sady V1 a V2 odpovídají předpokladu, že se zvyšujícím se vstupujícím množstvím oxidovaného BSA ve vzorku, bude detekován silnější signál ve formě absorbance, a tudíž i obsah karbonylovaných proteinů stanovených Levinovou metodou bude vyšší.

4.3.1 Sestavení kalibrační křivky karbonylovaného BSA po provedení Levinovy metody

Na základě prvotního experimentu vycházejícího ze studie Guedes et al. (2009) byl pro sestavení kalibrační křivky karbonylovaného BSA vybrán postup přípravy karbonylovaného BSA za silnějších oxidačních podmínek, tedy Ox10.

Po provedení Levinovy metody byla sestavena kalibrační křivka karbonylovaného BSA se sedmi body o koncentracích 0,100; 0,250; 0,500; 0,750; 1,000; 1,250; 1,500 mg·ml⁻¹ karbonylovaného BSA (Obr. 27).

V grafu kalibrační křivky karbonylovaného BSA je absorbance vztažena na koncentraci oxidovaného BSA. Je předpokládáno, že experimentálně provedená oxidace BSA proběhla kompletně, jelikož nebyla možnost srovnání a ověření reálné koncentrace karbonyl-BSA s komerčně oxidovaným BSA. Rovnice kalibrační křivky karbonylovaného BSA $y = 0,0928x - 0,0042$ s hodnotou spolehlivosti $R^2 = 0,9937$ byla použita pro výpočet koncentrace karbonylovaných proteinů u včelích vzorků. Takto vypočtená koncentrace byla následně porovnána s koncentrací vypočtenou ze vzorce (viz Rovnice 2 a 3).



Obrázek 27: Kalibrační křivka karbonylovaného BSA sestavená z absorpčních odpovídajících koncentracím 0,100; 0,250; 0,500; 0,750; 1,000; 1,250; 1,500 mg·ml⁻¹ karbonylovaného BSA po provedení Levinovy metody. Absorbance byla měřena při 360 nm.

Tím, že byla sestavena kalibrační křivka, která vypovídá o lineární závislosti mezi zvyšujícím se obsahem karbonylovaného BSA a odpovídajícím nárůstem absorbance je možno tvrdit, že Levinova metoda za zvolených podmínek funguje. Pro ověření tohoto tvrzení by metoda však měla být ještě zvalidována.

4.4 Příprava a extrakce včelích vzorků

Pro extrakci bylo použito 0,1-0,3 g biologického materiálu na jeden vzorek, což odpovídalo 4 celým vypreparovaným včelám, 11-13 kusům včelích hlav, 6 kusům hrudi a 10 kusům zadečku.

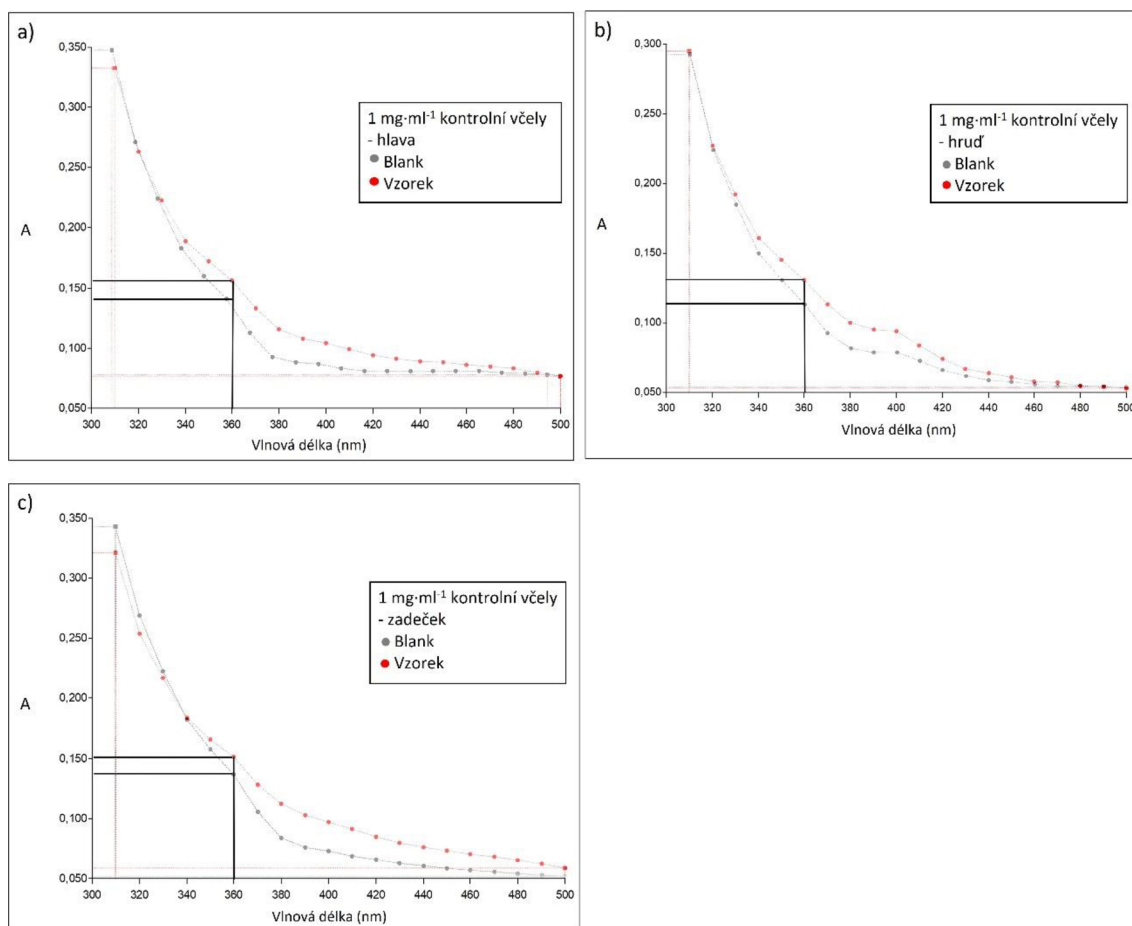
Nejdříve byla provedena extrakce v poměru 1:2, ale extrakt byl příliš hustý, proto byl zvýšen objem extrakčního pufru a byla prováděna extrakce v poměru 1:4. Následně byla změřena koncentrace celkových proteinů Bradfordovou metodou a včelí extrakty byly naředěny na koncentraci proteinů 1 mg·ml⁻¹, zmrazeny a uchovány pro následnou práci.

4.5 Levinova metoda pro stanovení karbonylovaných proteinů ve včelích vzorcích

Pro optimalizaci protokolu pro stanovení karbonylovaných proteinů ve včelích extraktech Levinovou metodou byly použity včely kontrolní, tzn. včely, které nepodlehly žádnému

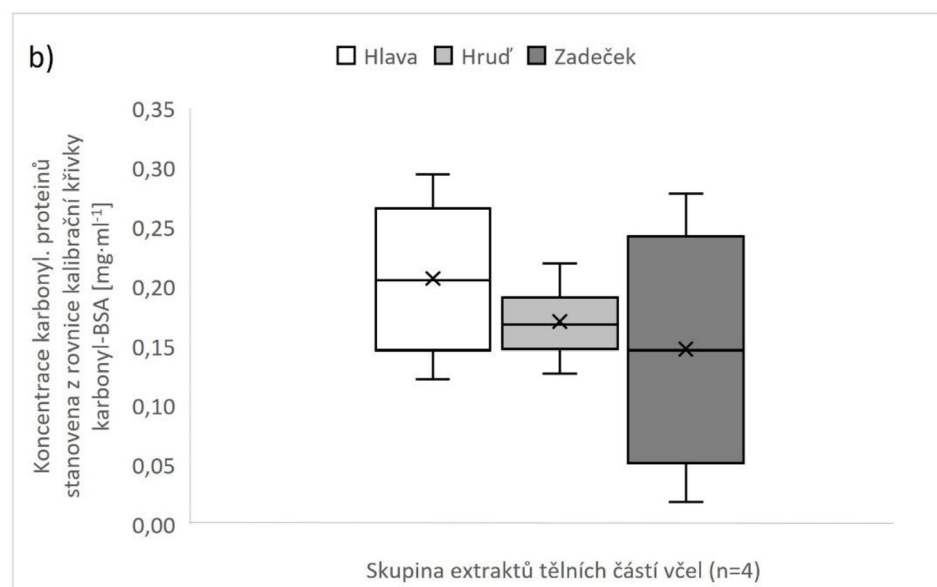
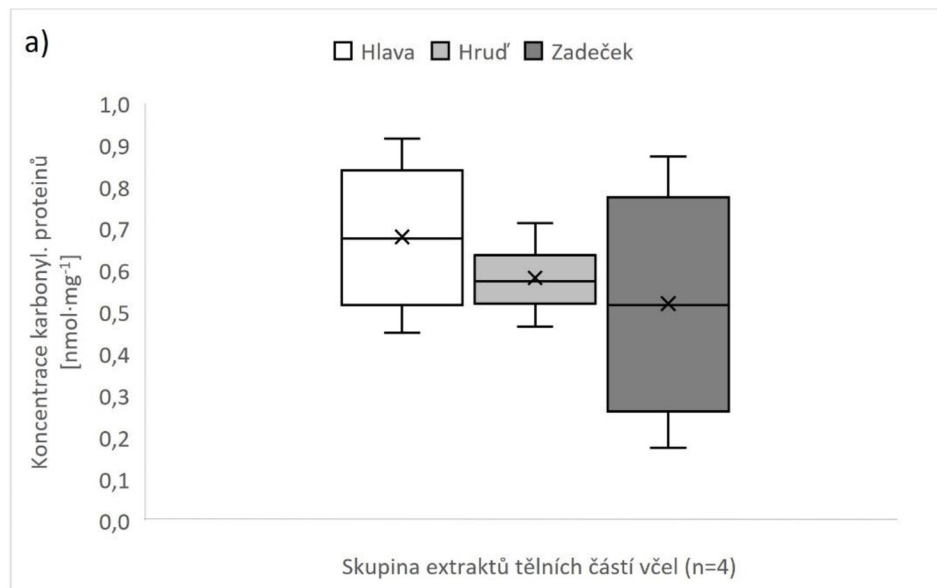
ošetření. Nejdříve byla metoda provedena u extraktů z celých těl o koncentraci proteinů $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Při finálním kroku Levinovy metody zahrnující rozpuštění pelety se pelet nepodařilo rozpustit v guanidium hydrochloridu (GuHCl) po čtyřicetiminutovém třepání v třepačce při $37 \text{ }^\circ\text{C}$, ani po přidání 1% roztoku detergentu Triton X-100, ani po použití ultrazvukové lázně dle studií, ve kterých byla Levinova metoda použita (Soglia et al., 2016). Vzorek, v němž se pelet proteinů zcela nerozpustil, nelze pro danou spektrofotometrickou analýzu použít.

Dále byla provedena Levinova metoda u jednotlivých tělních částí včel (Obr. 28). Byly připraveny extrakty z hlav, hrudí a zadečků o koncentraci proteinů $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Pelety se z finálního kroku Levinovy metody podařilo rozpustit ve všech vzorcích v GuHCl po třicetiminutovém třepání v třepačce. Důvodem může být přítomnost dalších látek vyextrahovaných spolu s proteiny, které mohou způsobovat těžší rozpouštění pelety. V extraktech připravených z jednotlivých tělních částí je těchto látek přítomno menší množství než v extraktu připraveném z celých včel.



Obrázek 28: Absorpční spektra pro blank a extrakty proteinů z kontrolních včel po stanovení obsahu karbonylovaných proteinů Levinovou metodou, přesněji a) extrakt hlavy, b) extrakt hrudě, c) extrakt zadečku, se zvýrazněním absorbancí při 360 nm.

Změřené absorbance při vlnové délce u vzorků hlav, hrudí a zadečků včel byly zaznamenány do programu Excel. Dále byla vypočtena koncentrace karbonylovaných proteinů dle vzorce (Rovnice 2) v jednotce $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, následně bylo vypočteno látkové množství karbonylu (Rovnice 3) a vztaheno na mg proteinů ($\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$). Dle rovnice z kalibrační křivky karbonylovaného BSA $y = 0,0928x - 0,0042$ s hodnotou spolehlivosti $R^2 = 0,9937$ byla vypočtena koncentrace karbonylovaných proteinů u všech vzorků v jednotce $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Stanovené koncentrace karbonylovaných proteinů v jednotlivých tělních částech včel jsou zobrazeny na Obr. 29.



Obrázek 29: Grafy koncentrací karbonylovaných proteinů z tělních částí kontrolních včel vypočtených z rozdílů absorbancí blanku a vzorku po provedení Levinovy metody a změření při 360 nm. Grafy byly sestaveny ze 4 biologických replikátů pro každou skupinu (n=4). Graf a) byl sestaven z koncentrací karbonylovaných proteinů vypočtených ze vzorce (viz Rovnice 2 a 3) v jednotce $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$. Graf b) byl sestaven z koncentrací karbonylovaných proteinů vypočtených z rovnice kalibrační křivky karbonyl-BSA ($y = 0,0928x - 0,0042$) v jednotce $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.

V rámci biologických replikátů včelích hlav a zadečků byly pozorovány značné rozdíly ve stanovených koncentracích karbonylovaných proteinů, například u vzorků zadečků 3 a 4 je rozdíl 61 %. Není ověřeno, co způsobuje interferenci při stanovení karbonylovaných proteinů Levinovou metodou v hlavové a zadečkové části. Vzorky hrudí daly poměrně stabilní výsledky.

Koncentrace karbonylovaných proteinů z extraktů včel vypočtené ze vzorce (Rovnice 2 a 3) a z rovnice kalibrační křivky karbonyl-BSA nelze vzhledem k rozdílným jednotkám, tedy odlišnému vyjádření, porovnat. Avšak nárůst či pokles hladin koncentrace u obou stanovení jsou stejného charakteru (Obr. 29).

Pro následující práci s paraquatem a PBS ošetřenými včelami byly zvoleny pro přípravu vzorků pouze hrudní části včel, jelikož z pilotního experimentu u kontrolní skupiny včel vyplývá, že je zde hladina karbonylovaných proteinů nejstálejší v rámci biologických replikátů včel, které pocházejí ze stejného zdroje, avšak pro potvrzení této hypotézy by muselo být provedeno stanovení karbonylovaných proteinů u mnohem vyššího počtu včel. Dále bylo předpokládáno, že v hrudníku vzhledem k přítomnosti letových svalů by zde mělo docházet ke zvýšené produkci karbonylovaných proteinů (Williams et al., 2008). Během letu u včel dochází k nadměrné produkci ROS, které mají za následek rozvoj oxidačního stresu a posléze se zvyšujícím se věkem včely dochází v letových svalech k oxidačnímu poškození DNA, lipidů a proteinů (Margotta et al., 2018).

4.5.1 Stanovení karbonylovaných proteinů ve včelích vzorcích ošetřených paraquatem

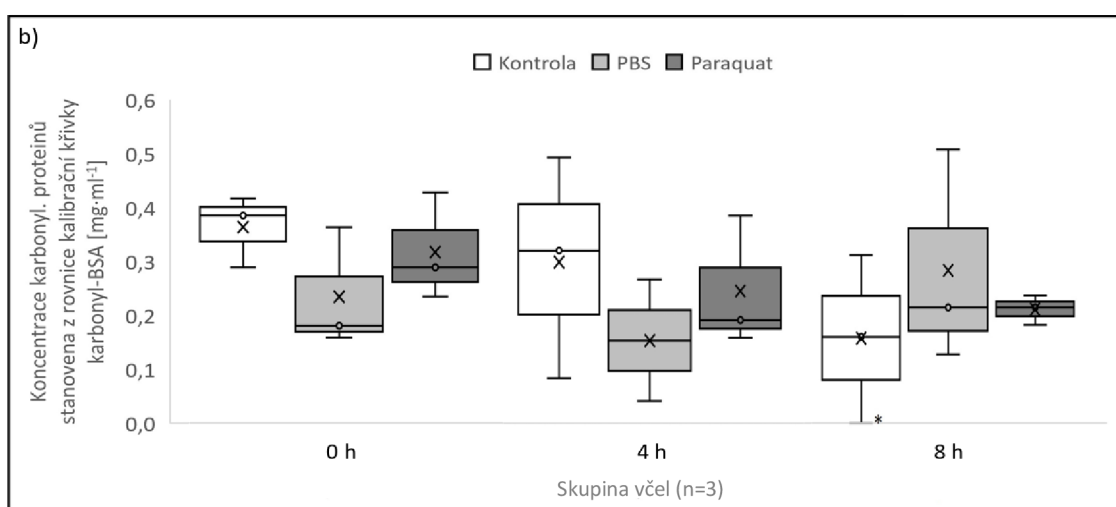
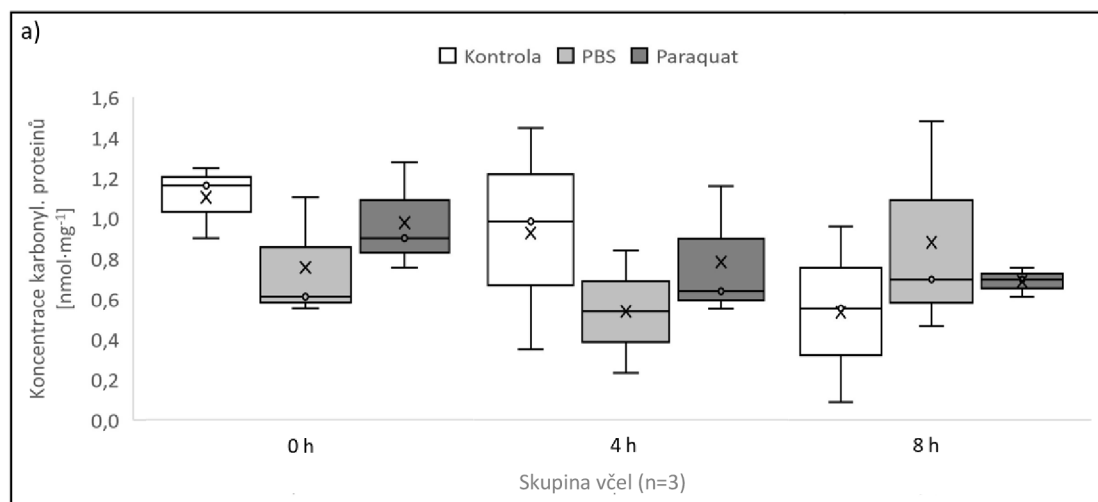
Paraquat je herbicid způsobující inhibici fotosyntézy u rostlin. U živých organismů paraquat indukce oxidačního stresu prostřednictvím tvorby superoxidových anion radikálů, přesněji jsou tvořeny po inhibici komplexu I v ETC paraquatem nebo činností cytochromu P450, který se podílí na detoxifikaci paraquatu (Li-Byarlay et al., 2016; de Mattos et al., 2018). Paraquat je využíván pro ošetření rostlin (např. ovocné sady), proto se v některých vědeckých studiích zaměřují na jeho vliv na opylovatele (Sartori & Vidrio, 2018). U včely medonosné injekce paraquatu rozvíjí oxidační stres, který má za následek mimo jiné i vznik karbonylovaných proteinů. Z tohoto důvodu je paraquat využíván jako induktor oxidačního poškození i ve studiích zaměřených na oxidační stres u včel (Li-Byarlay et al., 2016; Langberg et al., 2018).

Na přítomnost karbonylovaných proteinů byly testovány tři skupiny včel. Jedna skupina sestávala z kontrolních včel, další dvě skupiny sestávaly ze včel ošetřených paraquatem v PBS a samotným PBS. Skupina včel ošetřených PBS je další kontrolní skupinou, u které je sledováno, zda samotný vpich PBS u včely vyvolává oxidační

poškození, nebo dané poškození vyvolává testovaná látka, přesněji paraquat (Surachetpong et al., 2011; Langberg et al., 2018).

Před provedením Levinovy metody u ošetřených včel byly připraveny tři biologické vzorky ke každé skupině včel u každého času odběru při ošetření včel paraquatem či PBS, a to po 0, 4 a 8 h od injektování dané látky, taktéž u skupiny kontrolních včel, které byly odebrány ve stejných časových intervalech jako ošetřené včely. Každý biologický replikát obsahoval 6 hrudí dělnic z odpovídající skupiny. U skupiny včel ošetřených PBS byl u 4. hodiny nedostatek materiálu, z toho důvodu byly připraveny pouze dva biologické replikáty. Levinova metoda byla provedena ve třech sériích, vždy se všemi vzorky odpovídajícím času odběru po 0, 4 nebo 8 h od imunizace.

Po změření absorbance při 360 nm byla na základě rozdílů absorbancí všech vzorků a odpovídajících blanků vypočtena koncentrace karbonylovaných proteinů dle vzorce (viz Rovnice 2), a to v jednotce $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, dále bylo vypočteno látkové množství karbonylu (Rovnice 3) a vztaženo na mg proteinů ($\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$). Z rovnice kalibrační křivky BSA $y = 0,0928x - 0,0042$ s hodnotou spolehlivosti $R^2 = 0,9937$ byla vypočtena koncentrace karbonylovaných proteinů u všech vzorků v jednotce $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Koncentrace karbonylovaných proteinů u jednotlivých skupin jsou zobrazeny na Obr. 30.



*pod mezí stanovitelnosti

Obrázek 30: Grafy koncentrací karbonylovaných proteinů vypočtených z rozdílů absorbancí blanků a vzorků hrudníků kontrolních včel a včel ošetřených paraquatem a PBS s odběrem po 0, 4 a 8 h od začátku působení paraquatu či PBS. Absorbance byly změřeny po provedení Levinovy metody při 360 nm. Grafy byly sestaveny ze 3 biologických replikátů pro každou skupinu i hodinu odběru (n=3). Graf a) byl sestaven z koncentrací karbonylovaných proteinů vypočtených ze vzorce (viz Rovnice 2 a 3) v jednotce $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$. Graf b) byl sestaven z koncentrací karbonylovaných proteinů vypočtených z rovnice kalibrační křivky karbonyl-BSA ($y = 0,0928x - 0,0042$) v jednotce $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Na základě dříve provedené studie Alquicer et al. (2009) využívající injekci paraquatu pro vyvolání oxidačního stresu u hmyzu bylo předpokládáno zvýšení koncentrace karbonylovaných proteinů u ošetřených včel paraquatem. V rámci provedení Levinovy metody u včel ošetřených paraquatem stanovené koncentrace karbonylovaných proteinů neodpovídají předpokladu, jelikož se u včel se zvyšující dobou působení paraquatu koncentrace karbonylovaných proteinů snižovala (Obr. 30 a), b). Dále je koncentrace karbonylovaných proteinů u kontrolních včel vyšší než u včel ošetřených paraquatem.

Důvodem může být zvýšení činnosti antioxidačního systému z důvodu přítomnosti xenobiotika ve včelím organismu či působení opravných mechanismů způsobujících degradaci poškozených proteinů.

Byly zaznamenány značné rozdíly mezi změřenými absorbancemi u více vzorků měřených v jedné sérii, např. u skupiny včel ošetřených PBS u 8. h odběru činil rozdíl mezi vzorkem 1 a 2 69 %, to může být způsobeno špatným navázáním DNPH na karbonylované proteiny ve včelích extraktech nebo biologickými faktory působícími při imunizaci včel. Jedná se o pilotní experiment a pro detailní tvrzení a hypotézy by bylo potřebné větší množství opakování.

Mezi grafy 30a) a 30b) je rozdíl u skupiny kontrolních včel 8. h odběru, protože množství karbonylovaných proteinů u jednoho biologického replikátu bylo pod mezí stanovitelnosti metody při vyhodnocení koncentrace z rovnice kalibrační křivky, a proto byla tato koncentrace v grafu 30b) označena.

Nízké koncentrace karbonylovaných proteinů v hrudích ošetřených včel mohou být způsobeny zvýšenou aktivitou antioxidačních enzymů, jako je například katalasa (Williams et al., 2008). Ve vědecké práci Li-Byarlay et al. (2016) se zaměřovali na rezistenci a úmrtnost trubců po injekci paraquatu a vliv oxidačního stresu. Zjistily, že karbonylace proteinů se mezi ošetřenými a kontrolními skupinami trubců výrazně nelišila. To může být způsobeno zvýšenou antioxidační ochranou letových svalů či špatným pronikáním paraquatu do svalových buněk. Stanovení karbonylovaných proteinů v hrudníku, z důvodu přítomnosti letových svalů, nemusí být tedy za každých podmínek dostatečně citlivé pro určení míry oxidačního stresu u včel (Williams et al., 2008; Li-Byarlay et al., 2016).

5 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se věnuje reaktivním formám kyslíku, které ve svých vysokých hladinách vedou k oxidačnímu stresu způsobujícímu oxidační poškození biomolekul, a to především v zaměření na problematiku ROS a oxidačního stresu u včely medonosné (*Apis mellifera*).

V teoretické části byla shrnuta charakteristika reaktivních forem kyslíku a jejich vznik v živých organismech se zaměřením na včelu medonosnou. Dále byl popsán antioxidační systém, sestávající z enzymových a neenzymových antioxidantů, se zaměřením na hmyz a včelu medonosnou. Následně byly charakterizovány signální role ROS, oxidační stres a oxidační poškození DNA, lipidů a proteinů. Nakonec byly popsány metody stanovení oxidačně poškozených proteinů.

Cílem experimentální části byla optimalizace spektrofotometrické metody, tzv. Levinova metoda, pro stanovení karbonylovaných proteinů v extraktech včely medonosné. Nejprve byla provedena oxidace BSA, které bylo použito jako standard pro stanovení obsahu karbonylovaných proteinů, a sestavena kalibrační křivka karbonyl-BSA pro výpočet obsahu karbonylovaných proteinů ve vzorcích včelích extraktů. Kalibrační křivka karbonyl-BSA rovněž potvrdila lineární závislost mezi obsahem karbonylovaných proteinů a detekovaným signálem po provedení Levinovy metody.

Dále byla uskutečněna extrakce proteinů z celých těl i tělních částí včelích dělnic, následně byla v extraktech stanovena koncentrace karbonylovaných proteinů Levinovou metodou a pro další práci byla zvolena hrudní část včel. Nakonec byla provedena extrakce proteinů a stanovení koncentrace karbonylovaných proteinů u skupin včel ošetřených paraquatem a PBS a u skupiny kontrolních včel s odběrem po 0, 4 a 8 hodinách od injektování dané látky.

Bylo očekáváno zvýšení obsahu karbonylovaných proteinů u skupiny včel ošetřených paraquatem, což v experimentální části této bakalářské práce nebylo potvrzeno. Jednalo se však o pilotní experiment, pro který bude potřeba navazující práce s více opakováními a také s větším počtem vzorků.

6 LITERATURA

- Abreu, I. A., & Cabelli, D. E. (2010). Superoxide dismutases-a review of the metal-associated mechanistic variations. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1804(2), 263–274. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.11.005>
- Aguilar, M. (2004). HPLC of Peptides and Proteins Methods and Protocols. In *Methods in Molecular Biology* (pp. 3–8). Springer, Totowa, NJ. <https://doi.org/10.1385/1-59259-742-4:3>
- Al-Menhali, A. S., Banu, S., Angelova, P. R., Barcaru, A., Horvatovich, P., Abramov, A. Y., & Jaganjac, M. (2020). Lipid peroxidation is involved in calcium dependent upregulation of mitochondrial metabolism in skeletal muscle. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1864(3), 129487. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2019.129487>
- Alamdari, D. H., Kostidou, E., Paletas, K., Sarigianni, M., Konstas, A. G. P., Karapiperidou, A., & Koliakos, G. (2005). High sensitivity enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method for measuring protein carbonyl in samples with low amounts of protein. *Free Radical Biology and Medicine*, 39(10), 1362–1367. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.06.023>
- Alomari, E., Bruno, S., Ronda, L., Paredi, G., Bettati, S., & Mozzarelli, A. (2018). Protein carbonylation detection methods: A comparison. *Data in Brief*, 19, 2215–2220. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2018.06.088>
- Alquicer, G., Kodrik, D., Krishnan, N., Večeřa, J., & Socha, R. (2009). Activation of insect anti-oxidative mechanisms by mammalian glucagon. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 152(3), 226–233. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2008.11.007>
- Amdam, G. V., Fennern, E., & Havukainen, H. (2012). Vitellogenin in Honey Bee Behavior and Lifespan. In C. G. Galizia, D. Eisenhardt, & M. Giurfa (Eds.), *Honeybee Neurobiology and Behavior* (1st ed., pp. 17–29). Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-007-2099-2_2
- Augustyniak, E., Adam, A., Wojdyla, K., Rogowska-Wrzesinska, A., Willetts, R., Korkmaz, A., Atalay, M., Weber, D., Grune, T., Borsa, C., Gradinaru, D., Chand Bollineni, R., Fedorova, M., & Griffiths, H. R. (2015). Validation of protein carbonyl measurement: A multi-centre study. *Redox Biology*, 4, 149–157. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.12.014>
- Aurori, C. M., Buttstedt, A., Dezmirean, D. S., Mărghitaș, L. A., Moritz, R. F. A., & Erler, S. (2014). What is the main driver of ageing in long-lived winter honeybees: Antioxidant enzymes, innate immunity, or vitellogenin? *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, 69(6), 633–639. <https://doi.org/10.1093/gerona/glt134>
- Ayala, A., Muñoz, M. F., & Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014(6), 1–31. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>
- Bachi, A., Dalle-Donne, I., & Scaloni, A. (2013). Redox proteomics: Chemical principles, methodological approaches and biological/biomedical promises. *Chemical Reviews*, 113(1), 596–698. <https://doi.org/10.1021/cr300073p>
- Bayir, H. (2005). Reactive oxygen species. *Critical Care Medicine*, 33(12). <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000186787.64500.12>
- Berenbaum, M. R., & Johnson, R. M. (2015). Xenobiotic detoxification pathways in honey bees. *Current Opinion in Insect Science*, 10, 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.03.005>
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and

- antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9–19. <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>
- Blount, J. D., & McGraw, K. J. (2008). Signal Functions of Carotenoid Colouration. In G. Britton, S. Liaaen-Jensen, & H. Pfander (Eds.), *Carotenoids* (pp. 213–236). Birkhauser Verlag, Boston. https://doi.org/10.1007/978-3-7643-7499-0_11
- Bokare, A. D., & Choi, W. (2014). Review of iron-free Fenton-like systems for activating H₂O₂ in advanced oxidation processes. *Journal of Hazardous Materials*, 275, 121–135. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.04.054>
- Brodschneider, R., & Crailsheim, K. (2010). Nutrition and health in honey bees. *Apidologie*, 41(3), 278–294. <https://doi.org/10.1051/apido/2010012>
- Butler, K. E., Takinami, Y., Rainczuk, A., Baker, E. S., & Roberts, B. R. (2021). Utilizing Ion Mobility-Mass Spectrometry to Investigate the Unfolding Pathway of Cu/Zn Superoxide Dismutase. *Frontiers in Chemistry*, 9, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.614595>
- Cervoni, M. S., Cardoso-Junior, C. A. M., Craveiro, G., De Souza, A. O., Alberici, L. C., & Hartfelder, K. (2017). Mitochondrial capacity, oxidative damage and hypoxia gene expression are associated with age-related division of labor in honey bee (*Apis mellifera* L.) workers. *Journal of Experimental Biology*, 220(21), 4035–4046. <https://doi.org/10.1242/jeb.161844>
- Chaitanya, R. K., Shashank, K., & Sridevi, P. (2016). Oxidative Stress in Invertebrate Systems. *Free Radicals and Diseases, Chapter 3*, 51–68. <https://doi.org/10.5772/64573>
- Chelikani, P., Fita, I., & Loewen, P. C. (2004). Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61(2), 192–208. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3206-5>
- Cohen, G. (1994). Enzymatic/Nonenzymatic Sources of Oxyradicals and Regulation of Antioxidant Defenses. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 738, 8–14. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1994.tb21784.x>
- Colombo, G., Clerici, M., Garavaglia, M. E., Giustarini, D., Rossi, R., Milzani, A., & Dalle-Donne, I. (2016). A step-by-step protocol for assaying protein carbonylation in biological samples. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1019, 178–190. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.11.052>
- Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M., & Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal*, 17(10), 1195–1214. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0752rev>
- Corona, M., & Robinson, G. E. (2006). Genes of the antioxidant system of the honey bee: Annotation and phylogeny. *Insect Molecular Biology*, 15(5), 687–701. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2006.00695.x>
- Crans, D. C., Smee, J. J., Gaidamauskas, E., & Yang, L. (2004). The Chemistry and Biochemistry of Vanadium and the Biological Activities Exerted by Vanadium Compounds. *Chemical Reviews*, 104(2), 849–902. <https://doi.org/10.1021/cr020607t>
- D'Autréaux, B., & Toledano, M. B. (2007). ROS as signalling molecules: Mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(10), 813–824. <https://doi.org/10.1038/nrm2256>
- Dabrowska, N., & Wiczowski, A. (2017). Analytics of oxidative stress markers in the early diagnosis of oxygen DNA damage. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 26(1), 155–166. <https://doi.org/10.17219/acem/43272>
- Dalle-Donne, I., Aldini, G., Carini, M., Colombo, R., Rossi, R., & Milzani, A. (2006). Protein

- carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 10(2), 389–406. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2006.tb00407.x>
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., & Colombo, R. (2003). Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta*, 329(1–2), 23–38. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(03\)00003-2](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(03)00003-2)
- de M. Ochs, S., Fasciotti, M., Barreto, R. P., de Figueiredo, N. G., Albuquerque, F. C., Pontes Massa, M. C. G., Gabardo, I., & Pereira Netto, A. D. (2010). Optimization and comparison of HPLC and RRLC conditions for the analysis of carbonyl-DNPH derivatives. *Talanta*, 81(1–2), 521–529. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.12.036>
- de Mattos, I. M., Soares, A. E. E., & Tarpay, D. R. (2018). Mitigating effects of pollen during paraquat exposure on gene expression and pathogen prevalence in *Apis mellifera* L. *Ecotoxicology*, 27, 32–44. <https://doi.org/10.1007/s10646-017-1868-2>
- De Souza, D. A., Kaftanoglu, O., De Jong, D., Page, R. E., Amdam, G. V., & Wang, Y. (2018). Differences in the morphology, physiology and gene expression of honey bee queens and workers reared in vitro versus in situ. *Biology Open*, 7(11). <https://doi.org/10.1242/bio.036616>
- DeCoursey, T. E., & Ligeti, E. (2005). Regulation and termination of NADPH oxidase activity. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(19–20), 2173–2193. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5177-1>
- Dizdaroglu, M. (2012). Oxidatively induced DNA damage: Mechanisms, repair and disease. *Cancer Letters*, 327(1–2), 26–47. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.01.016>
- Do, H., Kim, I. S., Jeon, B. W., Lee, C. W., Park, A. K., Wi, A. R., Shin, S. C., Park, H., Kim, Y. S., Yoon, H. S., Kim, H. W., & Lee, J. H. (2016). Structural understanding of the recycling of oxidized ascorbate by dehydroascorbate reductase (OsDHAR) from *Oryza sativa* L. *Scientific Reports*, 6(19498), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep19498>
- Dostáľková, S., Dobeš, P., Kunc, M., Hurychová, J., Škrabišová, M., Petřivalský, M., Titěra, D., Havlík, J., Hyršl, P., & Danihlík, J. (2020). Winter honeybee (*Apis mellifera*) populations show greater potential to induce immune responses than summer populations after immune stimuli. *Journal of Experimental Biology*, 224(3), 1–40. <https://doi.org/10.1242/jeb.232595>
- Driessen, M. D., Mues, S., Vennemann, A., Hellack, B., Bannuscher, A., Vimalakanthan, V., Riebeling, C., Ossig, R., Wiemann, M., Schneckeburger, J., Kuhlbusch, T. A. J., Renard, B., Luch, A., & Haase, A. (2015). Proteomic analysis of protein carbonylation: A useful tool to unravel nanoparticle toxicity mechanisms. *Particle and Fibre Toxicology*, 12(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12989-015-0108-2>
- Enayati, A. A., Ranson, H., & Hemingway, J. (2005). Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Molecular Biology*, 14(1), 3–8. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2004.00529.x>
- Espinosa-Diez, C., Miguel, V., Mennerich, D., Kietzmann, T., Sánchez-Pérez, P., Cadenas, S., & Lamas, S. (2015). Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biology*, 6, 183–197. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.07.008>
- Farjan, M., Dmitryjuk, M., Lipiński, Z., Biernat-Łopieńska, E., & Zóltowska, K. (2012). Supplementation of the honey bee diet with vitamin C: The effect on the antioxidative system of *Apis mellifera carnica* brood at different stages. *Journal of Apicultural Research*, 51(3), 263–270. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.51.3.07>
- Felton, G. W., & Summers, C. B. (1995). Antioxidant systems in insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 29(2), 187–197. <https://doi.org/10.1002/arch.940290208>
- Freitinger Skalická, Z., Zölzer, F., Beránek, L., & Racek, J. (2012). Indicators of oxidative stress

- after ionizing and/or non-ionizing radiation: Superoxid dismutase and malondialdehyde. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 117, 111–114. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2012.08.009>
- Fridovich, I. (1997). Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 272, Issue 30, pp. 18515–18517). <https://doi.org/10.1074/jbc.272.30.18515>
- Friedman, R. (2011). Genomic organization of the glutathione S-transferase family in insects. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 61(3), 924–932. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.08.027>
- Gallagher, S. R. (2006). One-Dimensional SDS Gel Electrophoresis of Proteins. *Current Protocols in Molecular Biology*, 10(10). <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1002as75>
- Glish, G. L., & Vachet, R. W. (2003). The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(2), 140–150. <https://doi.org/10.1038/nrd1011>
- Guedes, S., Vitorino, R., Domingues, R., Amado, F., & Domingues, P. (2009). Oxidation of bovine serum albumin: Identification of oxidation products and structural modifications. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 23, 2307–2315. <https://doi.org/10.1002/rcm.4149>
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2015). Free Radicals in Biology and Medicine. In *Free Radicals in Biology and Medicine*. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001>
- Hamanaka, R. B., & Chandel, N. S. (2009). Mitochondrial reactive oxygen species regulate hypoxic signaling. *Current Opinion in Cell Biology*, 21(6), 894–899. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.08.005>
- 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(39), 28369–28381. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.465021>
- Heath, J. J., Cipollini, D. F., & Stireman, J. O. (2013). The role of carotenoids and their derivatives in mediating interactions between insects and their environment. *Arthropod-Plant Interactions*, 7(1), 1–20. <https://doi.org/10.1007/s11829-012-9239-7>
- Hecker, M., & Wagner, A. H. (2018). Role of protein carbonylation in diabetes. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 41(1), 29–38. <https://doi.org/10.1007/s10545-017-0104-9>
- Hellwig, M., Löbmann, K., & Orywol, T. (2015). Peptide backbone cleavage by α -amidation is enhanced at methionine residues. *Journal of Peptide Science*, 21(1), 17–23. <https://doi.org/10.1002/psc.2713>
- Janků, M., Danihlík, J., Petřivalský, M., & Martina, M. (2019). Oxidační stres a ochranný antioxidační systém včel. *Veterinářství*, 69(9), 607–611. <https://vetweb.cz/oxidacni-stres-a-ochranny-antioxidacni-system-vcel/>
- Kášparová, S., Brezová, V., Valko, M., Horecký, J., Mlynárik, V., Liptaj, T., Vančová, O., Uličná, O., & Dobrota, D. (2005). Study of the oxidative stress in a rat model of chronic brain hypoperfusion. *Neurochemistry International*, 46(8), 601–611. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2005.02.006>
- Kojo, S. (2005). Vitamin C: Basic Metabolism and Its Function as an Index of Oxidative Stress. *Current Medicinal Chemistry*, 11(8), 1041–1064. <https://doi.org/10.2174/0929867043455567>
- Konupková, A. (2020). *Role antioxidantů v predikci dlouhověkosti včely medonosné*, *Apis*

mellifera L. [Diplomová práce]. Masarykova univerzita Brno.

- Korayem, A. M., Khodairy, M. M., Abdel-Aal, A.-A. A., & El-Sonbaty, A. A. M. (2012). The protective strategy of antioxidant enzymes against hydrogen peroxide in honey bee, *Apis mellifera* during two different seasons. *Journal of Biology and Earth Sciences*, 2(2), 93–109. https://www.researchgate.net/publication/264891041_The_protective_strategy_of_antioxidant_enzymes_against_hydrogen_peroxide_in_honey_bee_Apis_mellifera_during_two_different_seasons
- Kord Forooshani, P., Pinnaratip, R., Polega, E., Tyo, A. G., Pearson, E., Liu, B., Folayan, T. O., Pan, L., Rajachar, R. M., Heldt, C. L., & Lee, B. P. (2020). Hydroxyl Radical Generation through the Fenton-like Reaction of Hematin- And Catechol-Functionalized Microgels. *Chemistry of Materials*, 32(19), 8182–8194. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.0c01551>
- Kramer, B. H., Nehring, V., Buttstedt, A., Heinze, J., Korb, J., Libbrecht, R., Meusemann, K., Paxton, R. J., Séguret, A., Schaub, F., & Bernadou, A. (2021). Oxidative stress and senescence in social insects: a significant but inconsistent link? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 376(1823), 20190732. <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0732>
- Kruger, N. J. (2009). The Bradford Method. In *The Protein Protocols handbook* (1st ed., pp. 17–24). Humana Press, Totowa, NJ. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-198-7_4
- Langberg, K., Phillips, M., & Rueppell, O. (2018). Testing the effect of paraquat exposure on genomic recombination rates in queens of the western honey bee, *Apis mellifera*. *Genetica*, 146, 171–178. <https://doi.org/10.1007/s10709-018-0009-z>
- Levine, R. L., Garland, D., Oliver, C. N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A. G., Ahn, B. W., Shaltiel, S., & Stadtman, E. R. (1990). Determination of Carbonyl Content in Oxidatively Modified Proteins. *Methods in Enzymology*, 186, 464–478. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86141-H](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86141-H)
- Li-Byarlay, H., Huang, M. H., Simone-Finstrom, M., Strand, M. K., Tarpy, D. R., & Rueppell, O. (2016). Honey bee (*Apis mellifera*) drones survive oxidative stress due to increased tolerance instead of avoidance or repair of oxidative damage. *Experimental Gerontology*, 83, 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2016.07.003>
- Lízalová, M. (2010). *Aplikace vybraných metod k analýze oxidačního stresu*. [Dizertační práce]. VUT Brno, Česká republika.
- Luo, S., & Wehr, N. B. (2009). Protein carbonylation: Avoiding pitfalls in the 2,4-dinitrophenylhydrazine assay. *Redox Report*, 14(4), 159–166. <https://doi.org/10.1179/135100009X392601>
- Lushchak, V. I. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions*, 224, 164–175. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.10.016>
- Mahmood, T., & Yang, P. C. (2012). Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, 4(9), 429–434. <https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998>
- Mann, M., Hendrickson, R. C., & Pandey, A. (2001). a Nalysis of P Roteins and P Roteomes By. *Annual Review of Biochemistry*, 70, 437–473. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.70.1.437>
- Margotta, J. W., Roberts, S. P., & Elekonich, M. M. (2018). Effects of flight activity and age on oxidative damage in the honey bee, *Apis mellifera*. *The Journal of Experimental Biology*, 221(Pt 14), 1–32. <https://doi.org/10.1242/jeb.183228>

- Matthijssens, F., Braeckman, B., & Vanfleteren, J. (2007). Evaluation of Different Methods for Assaying Protein Carbonylation. *Current Analytical Chemistry*, 3(2), 93–102. <https://doi.org/10.2174/157341107780361727>
- Mazurková, V. (2016). *Karboxylace lidského sérového albuminu glykačnými činidly: účinek karboxylreduktasy I.* [Diplomová práce]. Univerzita Karlova v Praze. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové.
- Medrzycki, P., Porrini, C., Montanari, R., Bortolotti, L., Sabatini, A. G., & Maini, S. (2003). Effects of imidacloprid administered in sub-lethal doses on honey bee behaviour. Laboratory tests. *Bulletin of Insectology*, 56(January), 59–62. https://www.researchgate.net/publication/242525057_Effects_of_imidacloprid_administered_in_sub-lethal_doses_on_honey_bee_behaviour_Laboratory_tests
- Mesquita, C. S., Oliveira, R., Bento, F., Geraldo, D., Rodrigues, J. V., & Marcos, J. C. (2014). Simplified 2,4-dinitrophenylhydrazine spectrophotometric assay for quantification of carbonyls in oxidized proteins. *Analytical Biochemistry*, 458, 69–71. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.04.034>
- Miller, J. W., Selhub, J., & Joseph, J. A. (1996). Oxidative damage caused by free radicals produced during catecholamine autoxidation: Protective effects of O-methylation and melatonin. *Free Radical Biology and Medicine*, 21(2), 241–249. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(96\)00033-0](https://doi.org/10.1016/0891-5849(96)00033-0)
- Münch, D., Amdam, G. V., & Wolschin, F. (2008). Ageing in a eusocial insect: Molecular and physiological characteristics of life span plasticity in the honey bee. *Functional Ecology*, 22(3), 407–421. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2008.01419.x>
- Nandi, A., Yan, L. J., Jana, C. K., & Das, N. (2019). Role of Catalase in Oxidative Stress- And Age-Associated Degenerative Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 1–19. <https://doi.org/10.1155/2019/9613090>
- Nebert, D. W., & Vasiliou, V. (2004). Analysis of the glutathione S-transferase (GST) gene family. *Human Genomics*, 1(6), 460–464. <https://doi.org/10.1186/1479-7364-1-6-460>
- Nedd, S., Redler, R. L., Proctor, E. A., Dokholyan, N. V., & Alexandrova, A. N. (2014). Cu,Zn-superoxide dismutase without Zn is folded but catalytically inactive. *Journal of Molecular Biology*, 426(24), 4112–4124. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.07.016>
- Ni, D., Xu, P., & Gallagher, S. (2017). Immunoblotting and immunodetection. *Current Protocols in Cell Biology*, 74(6). <https://doi.org/10.1002/cpcb.18>
- Niki, E. (2014). Role of vitamin e as a lipid-soluble peroxy radical scavenger: In vitro and in vivo evidence. *Free Radical Biology and Medicine*, 66, 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.03.022>
- Nikolenko, A. G., Saltykova, E. S., & Gaifullina, L. R. (2012). Molecular Mechanisms of Antioxidant Protective Processes in Honeybee *Apis mellifera*. *Oxidative Stress in Vertebrates and Invertebrates: Molecular Aspects of Cell Signaling*, 279–293. <https://doi.org/10.1002/9781118148143.ch20>
- Nikolić, T. V., Kojić, D., Orčić, S., Vukašinić, E. L., Blagojević, D. P., & Purać, J. (2019). Laboratory bioassays on the response of honey bee (*Apis mellifera* L.) glutathione S-transferase and acetylcholinesterase to the oral exposure to copper, cadmium, and lead. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(7), 6890–6897. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3950-6>
- Orčić, S., Nikolić, T., Purać, J., Šikoparija, B., Blagojević, D. P., Vukašinić, E., Plavša, N., Stevanović, J., & Kojić, D. (2017). Seasonal variation in the activity of selected antioxidant enzymes and malondialdehyde level in worker honey bees. *Entomologia Experimentalis et*

- Applicata*, 165(2–3), 120–128. <https://doi.org/10.1111/eea.12633>
- Panday, S., Talreja, R., & Kavdia, M. (2020). The role of glutathione and glutathione peroxidase in regulating cellular level of reactive oxygen and nitrogen species. *Microvascular Research*, 131, 104–110. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2020.104010>
- Pereira De Melo, I. L., & De Almeida-Muradian, L. B. (2010). Stability of antioxidants vitamins in bee pollen samples. *Quimica Nova*, 3(33). <https://doi.org/10.1590/s0100-40422010000300004>
- Piterková, J., Tománková, K., Luhová, L., Petřivalský, M., & Peč, P. (2005). Oxidativní stres: Lokalizace tvorby aktivních forem kyslíku a jejich degradace v rostlinném organismu. *Chemické Listy*, 99(7), 455–466. https://www.researchgate.net/publication/286919495_Oxidative_stress_Localisation_of_reactive_oxygen_species_formation_and_degradation_in_plant_tissue
- Pospišil, P., Prasad, A., & Rác, M. (2019). Mechanism of the formation of electronically excited species by oxidative metabolic processes: Role of reactive oxygen species. *Biomolecules*, 9(7), 258–279. <https://doi.org/10.3390/biom9070258>
- Rand, E. E. D., Smit, S., Beukes, M., Apostolides, Z., Pirk, C. W. W., & Nicolson, S. W. (2015). Detoxification mechanisms of honey bees (*Apis mellifera*) resulting in tolerance of dietary nicotine. *Scientific Reports*, 5(July), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep11779>
- Rassnigg, N. H., & Railsheim, K. C. (2005). Review article Differences in drone and worker physiology in honeybees (*Apis mellifera*). *Adipologie*, 36(2), 255–277. <https://doi.org/10.1051/apido>
- Rewitz, K. F., Styrišave, B., Løbner-Olesen, A., & Andersen, O. (2006). Marine invertebrate cytochrome P450: Emerging insights from vertebrate and insect analogies. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 143(4), 363–381. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.04.001>
- Rodríguez-García, A., García-Vicente, R., Morales, M. L., Ortiz-Ruiz, A., Martínez-López, J., & Linares, M. (2020). Protein carbonylation and lipid peroxidation in hematological malignancies. *Antioxidants*, 9(12), 1–30. <https://doi.org/10.3390/antiox9121212>
- Sandmann, G. (2019). Antioxidant protection from UV-and light-stress related to carotenoid structures. *Antioxidants*, 8(7), 1–13. <https://doi.org/10.3390/antiox8070219>
- Sartori, F., & Vidrio, E. (2018). Environmental fate and ecotoxicology of paraquat: a California perspective. In *Toxicological and Environmental Chemistry* (pp. 1–40). <https://doi.org/10.1080/02772248.2018.1460369>
- Schieber, M., & Chandel, N. S. (2014). ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current Biology*, 24(10), R453–R462. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>
- Schlothauer, J. C. (2013). Luminescence investigation of photosensitizer distribution in skin: correlation of singlet oxygen kinetics with the microarchitecture of the epidermis. *Journal of Biomedical Optics*, 18(11), 1–9. <https://doi.org/10.1117/1.jbo.18.11.115001>
- 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(4), 962–967. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502681103>
- Shigeoka, S. (2002). Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany*, 53(372), 1305–1319. <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.372.1305>
- Sies, H., & Jones, D. P. (2020). Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological

- signalling agents. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(7), 363–383. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3>
- Sies, H., Stahl, W., & Sevanian, A. (2005). Recent Advances in Nutritional Sciences Nutritional , Dietary and Postprandial. *J Nutr*, 135(11), 969–972. <https://academic.oup.com/jn/article-abstract/135/5/969/4663985>
- Simone-Finstrom, M., Li-Byarlay, H., Huang, M. H., Strand, M. K., Rueppell, O., & Tarpy, D. R. (2016). Migratory management and environmental conditions affect lifespan and oxidative stress in honey bees. *Scientific Reports*, 6, 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep32023>
- Soglia, F., Petracci, M., & Ertbjerg, P. (2016). Novel DNPH-based method for determination of protein carbonylation in muscle and meat. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.038>
- Stadtman, E. R., & Levine, R. L. (2003). Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*, 25(3–4), 207–218. <https://doi.org/10.1007/s00726-003-0011-2>
- Štípek, S. a kolektiv. (2000). *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci* (1. vydání). Praha Grada Publishing, Avicenum.
- Surachetpong, W., Pakpour, N., Cheung, K. W., & Luckhart, S. (2011). Reactive oxygen species-dependent cell signaling regulates the mosquito immune response to Plasmodium falciparum. *Antioxidants and Redox Signaling*, 14(6), 1–14. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3401>
- Taric, E., Glavinic, U., Vejnovic, B., Stanojkovic, A., Aleksic, N., Dimitrijevic, V., & Stanimirovic, Z. (2020). Oxidative stress, endoparasite prevalence and social immunity in bee colonies kept traditionally vs. Those kept for commercial purposes. *Insects*, 11(5), 1–13. <https://doi.org/10.3390/insects11050266>
- Tawfik, A. I., Ahmed, Z. H., Abdel-Rahman, M. F., & Moustafa, A. M. (2020). Influence of winter feeding on colony development and the antioxidant system of the honey bee, Apis mellifera. *Journal of Apicultural Research*, 59(5), 752–763. <https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1752456>
- Tjalkens, R. B., Cook, L. W., & Petersen, D. R. (1999). Formation and export of the glutathione conjugate of 4-hydroxy-2,3-E- nonenal (4-HNE) in hepatoma cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 361(1), 113–119. <https://doi.org/10.1006/abbi.1998.0946>
- Topală, T., Bodoki, A., Oprean, L., & Oprean, R. (2014). Bovine serum albumin interactions with metal complexes. *Clujul Medical*, 87(4), 215–219. <https://doi.org/10.15386/cjmed-357>
- Trnková, L., Dršata, J., & Boušová, I. (2015). Oxidation as an important factor of protein damage: Implications for Maillard reaction. *Journal of Biosciences*, 40(2), 419–439. <https://doi.org/10.1007/s12038-015-9523-7>
- Tu, C. Y., Chen, Y. F., Lii, C. K., & Wang, T. S. (2013). Methylglyoxal induces DNA crosslinks in ECV304 cells via a reactive oxygen species-independent protein carbonylation pathway. *Toxicology in Vitro*, 27(4), 1211–1219. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.02.011>
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160(1), 1–40. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>
- Walker, J. M. (1994). The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 32, 5–8. <https://doi.org/10.1385/0-89603-268-x:5>
- Wehr, N. B., & Levine, R. L. (2013). Quantification of protein carbonylation. *Methods in Molecular Biology*, 265–281. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-239-1_18

- Weirich, G. F., Collins, A. M., & Williams, V. P. (2002). Antioxidant enzymes in the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie*, *33*(1), 3–14. <https://doi.org/10.1051/apido:2001001>
- Welinder, C., & Ekblad, L. (2011). Coomassie staining as loading control in Western blot analysis. *Journal of Proteome Research*, *10*(3), 1416–1419. <https://doi.org/10.1021/pr1011476>
- Williams, J. B., Roberts, S. P., & Elekonich, M. M. (2008). Age and natural metabolically-intensive behavior affect oxidative stress and antioxidant mechanisms. *Experimental Gerontology*, *43*(6), 538–549. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2008.02.001>
- Wojciechowski, M., Lowe, R., Maleszka, J., Conn, D., Maleszka, R., & Hurd, P. J. (2018). Phenotypically distinct female castes in honey bees are defined by alternative chromatin states during larval development. *Genome Research*, *28*(10), 1532–1542. <https://doi.org/10.1101/gr.236497.118>
- Yamamoto, S. (1991). “Enzymatic” lipid peroxidation: Reactions of mammalian lipoxygenases. *Free Radical Biology and Medicine*, *10*(2), 149–159. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(91\)90008-Q](https://doi.org/10.1016/0891-5849(91)90008-Q)
- Zamocky, M., Furtmüller, P. G., & Obinger, C. (2008). Evolution of catalases from bacteria to humans. *Antioxidants and Redox Signaling*, *10*(9), 1527–1547. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2046>
- Zangar, R. C., Davydov, D. R., & Verma, S. (2004). Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *199*(3), 316–331. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.01.018>
- Zheng, S., Yoo, C., Delmotte, N., Miller, F. R., Huber, C. G., & Lubman, D. M. (2006). Monolithic column HPLC separation of intact proteins analyzed by LC-MALDI using on-plate digestion: An approach to integrate protein separation and identification. *Analytical Chemistry*, *78*(14), 5198–5204. <https://doi.org/10.1021/ac052284h>
- Zwiener, C., Glauner, T., & Frimmel, F. H. (2002). Method optimization for the determination of carbonyl compounds in disinfected water by DNPH derivatization and LC-ESI-MS-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *372*(5–6), 615–621. <https://doi.org/10.1007/s00216-002-1233-y>

6.1 Použitý software

ACD/ChemSketch Freeware version 12.0 pro tvorbu chemických struktur, rovnic a obrázků

Structure Drawing Software for Academic and Personal Use | ACD/ChemSketch. Chemistry Software for Analytical and Chemical Knowledge Management [online]. Copyright © 1996 [cit. 19.01.2022]. Dostupné z: <https://www.acdlabs.com/resources/freeware/chemsketch/>

Inkscape 0.92.4 for Windows pro tvorbu obrázků

Inkscape 1.1 - Windows | Inkscape. Draw Freely | Inkscape [online]. [cit. 19.01.2022]. Dostupné z: <https://inkscape.org/cs/release/1.1/windows/>

PyMOL Molecular Graphics System version 1.0.0 pro tvorbu kvartérních struktur proteinů

PyMOL | pymol.org. [online]. Copyright © 2022 Schrodinger. All Rights Reserved. [cit. 19.01.2022]. Dostupné z: <https://pymol.org/2/>

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

4-HNE	4-hydroxynonenal
8-OHdG	8-hydroxy-2'-deoxyguanosin
AK	Aminokyselina
BSA	Hovězí sérový albumin (<i>bovine serum albumine</i>)
CAT	Katalasa
DNP	2,4-dinitrofenylhydrazon
DNPH	2,4-dinitrofenylhydrazin
ELISA	enzymová imunoanalýza s enzymem vázaným na sorbentu (<i>Enzyme linked immuno sorbent assay</i>)
FAD	Flavinadenindinukleotid
GPX	Glutathion peroxidasa
GSH	Redukovaný glutathion
GSSG	Oxidovaný glutathion
GST	Glutathion-S-transferasa
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
HPR	Enzym křenová peroxidasa
JV	Juvenilní hormon
MDA	Malondialdehyd
MK	Mastná kyselina
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotid fosfát
PBS	Fosfátový pufr (<i>phosphate buffered saline</i>)
PUFA	Polynenasycená mastná kyselina
PVDF	Polyvinyliden-difluorid
SDS	Dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecylsulphate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SOD	Superoxiddismutasa