

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

**Obranné reakce včel vůči přírodním toxinům**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor: Bc. Klára Kainzová

Vedoucí práce: prof. RNDr. Dalibor Kodrík, CSc.

Místo a rok vydání: České Budějovice, 2023

Kainzová, K., 2023: Obranné reakce včel vůči přírodním toxinům. [Bee defense responses to natural toxins. Master thesis, in Czech] – 40. p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

## **ANNOTATION**

The aim of this master thesis was to describe the effect of honeybee venom on several physiological characteristics in the honeybees *Apis mellifera* themselves. They included the expression and level of vitellogenin in selected organs, AKHs production in CNS, level of dopamine in brain, fat body and Malpighian tubules, oxidative stress (the activity of catalase) and the structure of thoracic muscles in workers and drones. Results showed that the bee venom did not change the AKH level in CNS. However, the envenomation decreased the expression of vitellogenin in fat body, as well as the level of vitellogenin proteins both in fat body and haemolymph. Catalase activity was increased in the gut of workers but decreased in the gut of drones. The venoms application slightly increased dopamine levels in the fat body, brain and Malpighian tubules, but only in the fat body the rise was significant. Honeybee venom damaged the structures of myofibrils and mitochondria in the thoracic muscles of workers, however, co-application of the venom with AKH generally abolished this effect; situation in drones remains unknown.

## **Prohlášení**

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

V Českých Budějovicích dne 6. 12. 2023

.....

Bc. Klára Kainzová

## Poděkování

Velice děkuji všem, kteří se na této práci podíleli, především panu prof. RNDr. Daliboru Kodříkovi, CSc., za celkové seznámení s tématem a za poskytnutí laboratoře a materiálu pro uskutečnění všech pokusů, a hlavně za obrovskou trpělivost a odborné rady při zpracování mé magisterské práce. Dále bych chtěla poděkovat paní Ing. Heleně Štěřbové, Mgr. Markétě Hejníkové Ph.D. a Mgr. Janovi Černému za velmi cenné rady a za pomoc s prací v laboratoři. Váš přístup a nasazení k práci jsem po celých 5 let obdivovala a doufám, že jsem si alespoň zlomek z toho odnesla. Děkuji také Laboratoři elektronové mikroskopie za zhotovení vzorků pro TEM a jejich vlídný přístup. V neposlední řadě děkuji celé své rodině, která mě podporuje po celou dobu studia.

## Obsah

1	Úvod.....	1
1.1	Přírodní živočišné jedy .....	1
1.1.1	Včelí žihadlo – anatomie a mechanismus bodnutí .....	1
1.1.2	Včelí jed .....	2
1.1.3	Klinické využití včelího jedu .....	5
1.2	Antistresové reakce.....	6
1.2.1	Hmyzí antistresové hormony .....	6
1.3	Modelový organismus – Včela medonosná ( <i>Apis mellifera</i> ).....	8
2	Cíle práce.....	9
3	Materiály a metodika.....	10
3.1	Chov včely medonosné ( <i>A. mellifera</i> ) .....	10
3.2	Aplikace včelího jedu .....	10
3.3	Odebírání hemolymfy .....	10
3.4	Pitva včelích orgánů .....	10
3.5	Stanovení relativní hladiny vitellogeninu v jednotlivých orgánech pomocí ELISA. ....	11
3.6	Relativní exprese vitellogeninu v tukovém tělese .....	12
3.6.1	Izolace RNA.....	13
3.6.2	Reverzní transkripce.....	13
3.6.3	Real time PCR.....	14
3.7	Měření aktivity katalázy .....	15
3.8	Biogenní aminy – dopamin.....	16
3.9	Transmisní elektronová mikroskopie (TEM) .....	16
3.10	Skenovací elektronová mikroskopie (SEM).....	17
4	Výsledky.....	18
4.1	Vliv včelího jedu na mortalitu .....	18
4.2	Vliv včelího jedu na expresi vitellogeninu v tukovém tělese .....	18

4.3	Vliv včelího jedu na hladinu vitellogeninu v jednotlivých včelích orgánech .....	19
4.4	Vliv včelího jedu na oxidační stres (kataláza).....	21
4.5	Účinek včelího jedu na hladinu dopaminu .....	23
4.6	Účinek včelího jedu na thorakální (létací) svalovinu .....	25
5	Diskuze.....	30
6	Závěr.....	33
7	Seznam použité literatury .....	34

# 1 Úvod

## 1.1 Přírodní živočišné jedy

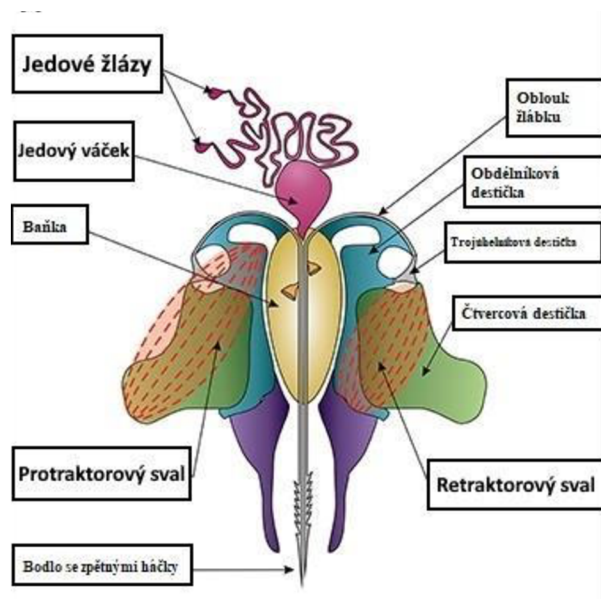
Přírodní jedy živočichů řadíme mezi chemické látky, které mohou působit velice nepříznivě na jiné organismy a způsobit jim závažná poškození anebo dokonce smrt. Tyto látky jsou produkovány převážně ve speciálních žlázách a jejich úloha je velice jednoduchá: slouží totiž především jako chemická zbraň k obraně proti predátorům anebo k samotné predaci. Pokud jsou jedy aktivně syntetizovány samotným živočichem, mluvíme o primární jedovatosti. O sekundární jedovatosti mluvíme v případě, kdy živočich získává a shromažďuje jedy z potravy (Hrdina, 2004).

Živočišných jedů existuje v přírodě celá řada, liší se složením i finálním účinkem na oběť a některé z nich mohou mít prospěšné využití pro člověka (Patočka, 2004). Mezi hmyzem jsou jedy poměrně běžné u řady zástupců blanokřídlých (*Hymenoptera*), kam patří i včela medonosná (*Apis mellifera*). Účinek hlavních toxinů včelího jedu je dobře prostudován, ale řada detailů, stejně tak jako funkce minoritních toxinů jedu, zůstávají neznámé. Proto je velmi žádoucí včelí jed nadále zkoumat.

### 1.1.1 Včelí žihadlo – anatomie a mechanismus bodnutí

Včelí jed je produkován v žihadlovém aparátu, který se nachází jen u dělnic a královen, trubci ho nemají. Dělnice používají žihadlo především k obraně sebe anebo svého úlu, případně k útokům na jiné včely či jiné živočichy.

Při samotném bodnutí včela stáhne zadeček dolů, vysune žihadlo a jeho bodlo, tvořené dvěma žihadlovými štětinkami, zapíchne do napadeného organismu. Důležitou částí žihadla jsou vratizoubky, které se zachytí v oběti a při klouzavém pohybu pronikají hlouběji do tkáně. (Veselý a kol., 2003). Nicméně vratizoubky brání také vytažení žihadla po vbodnutí; pokud se o to včela snaží, tak dojde k vytržení žihadlového aparátu spolu se zadečkovou částí a včela zahyne. Zadečková část obsahuje ganglium, které zůstává funkční i po odtržení od těla a řídí dále svaly, které pumpují jed do rány ještě několik minut poté. K vytržení zadečkové části dochází ale jen v případě, že včela bodne savce anebo ptáka, když bodne jiný hmyz, tak lze žihadlo vytáhnout a včela přežije. Je to zapříčiněno stavbou hmyzího integumentu (Bogdanov, 2016; Weyda a Kodrík., 2020). Přesná anatomie žihadlového aparátu je popsána na obr. 1 viz níže.



Obr. 1. Struktura žihadlového aparát. Převzato a upraveno podle Spurného, 2021

### 1.1.2 Včelí jed

Včelí jed představuje bezbarvou kapalinu s hořkou chutí a charakteristickým aroma. Je tvořen v jedové žláze (obr. 1). Jedová žláza funguje ihned po vylíhnutí imága, avšak k maximálnímu naplnění jedového váčku dochází až ve věku 14–20 dní (Kamler a kol., 1998). Během života včely je jed uchováván v jedovém váčku, který se nachází v zadečkové části těla včely. V tomto váčku se obvykle nachází 0,1-0,3 mg surového jedu. Přesné množství závisí na stáří včely, obsahu bílkovin v potravě, a také klimatických podmínkách a ročním období (Demeter, 2021). Obecně včela používá svůj jed k obraně proti svým predátorům, včetně hmyzích, ale i proti jedincům svého vlastního druhu. Jedová žláza je přítomna jak u dělnic, tak i u královen. Nicméně královny mají anatomicky větší jedové žlázy, aby produkovaly více jedu. Na rozdíl od dělnic královny nepoužívají svůj jed na obranu celé kolonie, ale na svoji vlastní obranu a na boj s jinou královnou, a to krátce po vylíhnutí imága (Kato, 1994). Samotný jed včelí královny je smrtelnější pro jiné včely, než jed dělnic (Collison, 2015). Včelí jed je stále předmětem výzkumu, studuje se jeho potenciál v léčbě různých onemocnění, včetně rakoviny, neurologických onemocnění a autoimunitních chorob (Demeter, 2021) (viz také níže).

#### 1.1.2.1 Složení včelího jedu a jeho vliv na organismus

Včelí jed je, podobně jako jedy ostatních živočichů, komplexní směsí několika desítek biologicky aktivních látek, které jsou rozpustné ve vodném roztoku. Sušina činí v tomto roztoku zhruba 30 %. Melitin je nejdůležitější složkou včelího jedu a tvoří zhruba polovinu celkové hmotnosti sušiny. Chemicky je to peptid o 26 aminokyselinách (Veselý a kol., 2003), který

vzniká během složitého procesu z prekurzoru promelitinu (Habermann, 2011). Další důležitou složkou je apamin, což je polypeptid, který je složen z 18 aminokyselin. Tento neurotoxický peptid je schopen procházet hematoencefalickou bariérou, kde působí jako alosterický inhibitor vápenatých iontů aktivovaných draselnými kanály (Lamy a kol., 2010; Pease a Wemmer a kol., 1988). Další důležitou součástí je degranulační peptid žírných buněk, který je tvořen 22 aminokyselinami, 10 aminokyselin je bazických (Kumar a kol., 1988), což hraje důležitou roli při stimulaci histaminu z žírných buněk (Ziai a kol., 1990). Jedním z potenciálních způsobů stimulace histaminu je schopnost napodobit specifickou sekvenci aminokyselin v konstantní doméně těžkého řetězce imunoglobulinu E, což indukuje degranulaci žírných buněk (Jasani a kol., 1979). V neposlední řadě je ve včelím jedu obsažen MCD (mast cell degranulating) peptid nebo minimim. Další látky, jako například histamin, dopamin nebo noradrenalin, jsou obsaženy pouze ve stopovém množství. Včelí jed obsahuje také vitellogenin, který zřejmě stimuluje jeho alergické vlastnosti (Salmela a kol., 2015).

Hlavními symptomy účinku včelího jedu je bolest, svědění, zčervenání a otok v místě vpichu žihadla. To je způsobeno účinkem přítomných toxinů. Hlavním mechanismem jedu je porušení buněčných membrán, což je způsobeno melitinem a fosfolipázami. Takovéto narušení vede k vylití obsahu buněk a k jejich následné apoptóze. Tento proces je také stimulován enzymem hyaluronidázou, který rozkládá jednotlivé spoje mezi buňkami, což umožňuje jedu rychleji pronikat do tkání a dosahovat hlouběji až k cévám. Důležitou roli hrají také biogenní aminy, jako je dopamin a noradrenalin, které stimulují srdeční činnost a pomáhají transportovat jed po celém těle oběti. Citlivost tkání na včelí jed je zvýšena serotoninem. Další důležitou složkou je histamin, který je jednak obsažen v jedu a jednak se uvolňuje poškozenými tkáněmi. Je zodpovědný za zčervenání a otok v místě vpichu, zvyšuje propustnost kapilár, stimuluje zánět a spouští další imunitní reakce a může vyústit až v anafylaktický šok (Bogdanov, 2016; Hossen, 2017). Mechanismus vyvolání anafylaktického šoku je způsoben také vlivem degranulačního peptidu žírných buněk. Tento peptid je schopen při nízkých dávkách vyvolat anafylaktoidní reakci, kdy dochází ke vzniku lokálních otoků, dilataci krevních kapilár a kontrakcím hladké svaloviny, kterou jsou způsobené mediátory, například histaminem, viz výše. Naopak vysoká koncentrace tohoto peptidu vede k opačnému účinku – inhibice degranulace žírných buněk, což může být použito v terapeutických metodách jako antialergická molekula (Hanson a kol., 1974).

Včelí jed obecně a jednotlivé složky v něm obsažené jsou velmi efektivní i na lidský organismus. I jediné bodnutí může vést k vyvolání výše zmíněných příznaků, nicméně zdravý



dospělý člověk přežije i několik stovek včelích bodnutí. Působení jednotlivých složek obsažených ve včelím jedu je v těle oběti vzájemně propojeno, a tak se jednotlivé složky navzájem stimulují, což vede ke zvýšené účinnosti jedu.

### 1.1.2.2 Vitellogenin

Jak je již výše uvedeno, včelí jed obsahuje i malé množství vitellogeninu. Funkce vitellogeninu ve včelím jedu není přesně známa, nicméně skupina Blank a kol. (2013) navrhli, že by mohl spouštět a stimulovat alergické reakce v těle oběti. Dále bylo zjištěno, že množství vitellogeninu kolísá během roku.

V toxinech jiných skupin blanokřídlého hmyzu nebyla prokázána přítomnost vitellogeninu. Nicméně některé prekurzory vitellogeninů a jim podobným proteinům se nacházejí u některých vosiček (Chai a kol., 2018; Park a kol., 2010).

Většina živočichů používá vitellogenin jako základní stavební jednotku proteinů, které tvoří žloutek vajíčka, ani u hmyzu tomu není jinak. Hmyzí vitellogeniny jsou glyko-lipo-fosfoproteiny (Chapman, 1998), o přibližné molekulové hmotnosti 210 až 650 kDa. Většina skupin hmyzu tvoří své vitellogeniny v tukovém tělese, konkrétně v trofocytech. Tukové těleso se velice podobá játrům u obratlovců. Hlavní roli hrají vitellogeniny v procesu zvaném vitellogeneze, při tomto procesu dochází k přenosu potřebných živin, energie do vaječnicků nebo do jiných potřebných částí organismu, v podobě žloutku. Trofocyty během vitellogeneze prochází důležitými změnami, aby došlo k přeměně těchto skladovacích buněk na ty specializované s vysokou produkcí proteinů. Tuto transformaci můžeme rozdělit na dvě fáze – previtelogeninová a vitellogeninová. Při první fázi dochází ke zvětšování buněk a Golgiho aparátu a také k proliferaci ribozomů, v druhé fázi se stává produkce proteinů prioritou. Po vytvoření základních proteinů dochází k jejich fosforylaci, anebo glykosylaci a přidávají se k nim také tukové složky. Takto upravené se posléze pomocí hemolymfy transportují do cílových tkání.

### 1.1.2.3 Role vitellogeninu v obranných a imunitních reakcích hmyzu proti patogenům, bakteriím, vliv na oxidační stres

Vitellogenin však nehraje roli pouze při tvorbě vaječného žloutku, ale také aktivuje imunitní reakce. Skupině Singh a kol. (2013) se podařilo dokázat velice silná antibakteriální odpověď vitellogeninu proti gramnegativním a grampozitivním bakteriím, tato studie byla provedená na včele medonosné a na bourci morušovém (*Bombyx mori*). Velice zajímavým poznatkem je

skutečnost, že je vitellogenin aktivní proti bakterii *Paenibacillus larvae* (Salmela a kol., 2015), která způsobuje jednu z nejzávažnějších nemocí včel – včelí mor.

Reaktivní formy kyslíků (ROS) jsou nevyhnutelnými produkty aerobního metabolismu u živočichů a podílejí se na některých fyziologických procesech – obrana proti bakteriím (Cremer a kol., 2007). Reaktivní kyslíkové radikály jsou tvořeny různými zdroji, tyto zdroje lze rozdělit na endogenní a exogenní. Mezi exogenní příčiny řadíme např. změnu teploty, působení ionizačního a UV záření (Lushchak, 2011). Dále se předpokládá, že jsou ROS produkovány také po environmentální kontaminaci různými insekticidy a herbicidy (Kodrík a kol., 2015). Do skupiny endogenních příčin řadíme změnu elektronů v elektron-transportním řetězci (endoplazmatické retikulum anebo mitochondrie). V neposlední řadě produkci ROS vyvolávají některá xenobiotika (Lushchak, 2011).

Velice důležitá je rovnováha mezi produkcí a eliminací ROS, pokud dojde k vyšší produkci ROS, než je organismus schopný zvládnout, začnou se u buněk objevovat známky oxidačního stresu. Například u hmyzu se kyslík přenáší přímo do tkání difuzí a během svého života je velice aktivní v aerobních činnostech, při kterých dochází ke tvorbě velkého množství ROS (Fridovich, 1978), které není již organismus schopný zvládat. Oxidační stres působí na biologicky aktivní molekuly. Tato skutečnost vede k jejich oxidaci, a tím pádem k jejich poškození a ke ztrátě funkce biomakromolekul (lipidy, proteiny, nukleové kyseliny) (Beckman a Ames, 1998). Proto se během evoluce vyvinuly různé obranné mechanismy, které zahrnovaly enzymatické, anebo neenzymatické strategie (Fridovich, 1978). U hmyzu jsou tyto obranné mechanismy velice často regulovány adipokinetickými hormony (Bednářová a kol., 2013; Kodrík a kol., 2015). Nicméně vysoká aktivita antioxidačního systému vede k odstranění nadbytečného množství ROS, což může vést ke zhoršené funkci některých signalizačních procesů (Baltacıoglu a kol., 2008). Testy přežití po paraquatu při použití linie vg<sup>+</sup> a vg<sup>-</sup> s vypnutým genem pro vitellogenin dokázaly, že aktivita genu pro vitellogenin má vliv na odolnost dělnic na oxidační stres (Amdam a kol., 2005). Ve studii skupiny Havukainen a kol. (2013) bylo prokázáno, že buňky obsahující vitellogenin mají vyšší odolnost vůči oxidačnímu stresu, který byl způsoben peroxidem vodíku.

### 1.1.3 Klinické využití včelího jedu

Včelím jedom a jeho praktickým využitím proti různým chorobám či v prevenci se zabývají vědci již spoustu let a v mnoha studiích je pozitivní účinek jedu dokázán.

V první řadě se dnes včelí jed používá ke specifické alergenové imunoterapii. Tato terapie je velice účinnou léčbou, která se snaží zabránit závažným stavům způsobených alergickou reakcí

při opakovaném setkání s alergenem (včelím jedom) (Golden, 2005). Specifická alergenová imunoterapie spočívá v dlouhodobém podání včelího jedu a jeho zvyšujících se dávek, což vede ke zmírnění projevů nebo k úplnému vymizení alergické reakce u senzibilního jedince (Durham a kol., 1999).

U včelího jedu byly také prokázány vlivy na neurodegenerativní choroby, které postihují centrální nervovou soustavu (CNS). Jelikož tyto choroby nejsou léčitelné, tak dochází alespoň k hledání alternativních řešení, která by vedla k potlačení anebo k zastavení dalších degenerací. Toxinem včelího jedu, který lze využít při léčbě Alzheimerovi choroby a Parkinsonovi choroby, je třeba apamin (Baek a kol., 2018).

V neposlední řadě je včelí jed také využíván při léčbě aterosklerózy, jaterní fibrózy, a dokonce u některých nádorových onemocnění (Park a kol., 2010; Jeong a kol., 2012).

## 1.2 Antistresové reakce

Stres je soubor nepříznivých podmětů na organismus fyzického, anebo psychického charakteru. Jelikož se stres týká každého organismu, tak bylo v evoluci nezbytně důležité, aby došlo k vytvoření obranných reakcí, které umožňují zmírnit účinky stresu na organismus nebo ho úplně eliminovat. Tato skutečnost zvýšila šanci nejen na přežití, ale také umožnila diverzifikaci a regulaci fyziologických procesů s cílem maximalizovat účinnost (Bodláková, 2020). Vlastní podmět se nazývá stresor. Stresory ovlivňující živočichy můžeme rozdělit podle jejich působení na vnější a vnitřní a mohou být fyzikální, chemické anebo biologické povahy. Mezi biologické stresory patří predátoři, parazité nebo infekční mikroorganismy, zatímco do chemických řadíme různé jedy, toxiny, polutanty a další. Mezi fyzikální stresory řadíme klimatické změny a další vnější podměty. Tyto stresory vyvolají obranné anti-stresové reakce, jejímž cílem je obnovení normálního stavu organismu neboli homeostázy. Při řízení těchto reakcí úzce spolupracují nervová soustava s endokrinní soustavou. Nervová soustava dokáže reagovat na stres okamžitě na rozdíl od endokrinní, která reaguje dlouhodobě pomocí hormonů a biogenních aminů.

### 1.2.1 Hmyzí antistresové hormony

Mezi nejdůležitější hmyzí antistresové hormony řadíme adipokinetické hormony (AKH), což jsou peptidické neurohormony. Jde o jednu z nejprobádanějších skupin hormonů mezi členovci. Do dnešního dne je popsáno už přes 100 různých druhů těchto hormonů. Adipokinetické hormony jsou peptidy o délce 8–10 aminokyselin, pouze u motýla *Vanessa cardui* obsahují 11 aminokyselin. Na svém C konci obsahují amidovou skupinu, zatímco na N konci obsahují kyselinu pyroglutamovou.

Tyto hormony jsou syntetizovány v neurosekretorických buňkách endokrinní žlázy *corpora cardiaca* (Gäde a kol., 1997; Kodrík, 2008). *Corpora cardiaca* jsou umístěna v blízkosti mozku a obvykle nasedají na aortu a tím pádem fungují jako neurohemální orgán i pro mozkové neurohormony, protože do nich vedou zakončení axonů jejich neurosekretorických mozkových buněk (Kodrík, 2008).

Antistresovou funkci těchto hormonů lze sledovat v základní metabolické rovině, kde se projevuje na biochemických, fyziologických úrovních, což vede ke komplexní antistresové odpovědi organismu. Hlavní funkce AKH je mobilizace energetických zásob, které se využívají na řešení stresové situace. Zásoby se zpravidla mobilizují z buněk tukového tělesa hmyzu. Adipokinetické hormony se zde naváží na specifické receptory, které jsou spřažené s G – proteiny, a ty jsou tvořeny třemi podjednotkami  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$ . Po navázání samotného hormonu, dochází k rozpadu G – proteinu na dvě části -  $\alpha$  podjednotku spojenou s GTP a na  $\beta$ ,  $\gamma$  podjednotku. Obě podjednotky jsou schopné difundovat podél membrán, transportovat se k místu svého určení a aktivovat tak další kaskády (Gäde a kol., 1997; Gäde a Auerswald, 2003).

První kaskádou je dráha cyklického AMP, kdy je aktivovaná podjednotka  $\alpha$  spojená s GTP a ta mění koncentraci druhého posla – cAMP pomocí adenylátcyklázy, která tvoří cAMP štěpením ATP. cAMP je velice dobře rozpustný ve vodě, což vede k rychlému transportu signálu v cytosolu. Tyto účinky jsou realizovány pomocí A – kinázy, kterou cAMP aktivuje. A – kináza poté katalyzuje fosforylaci a tím pádem aktivaci příslušných enzymů. Specifita účinku hormonů je dána pomocí aktivace různých enzymů v různých typech buněk (Gäde a Auerswald, 2003).

Určité AKH signály využívají odlišnou cestu. Během této cesty dochází prostřednictvím G – proteinů k aktivaci jiného membránového enzymu – fosfolipázy C. Ta interaguje s inositolovým fosfolipidem, který se následně štěpí na inositol-1,4,5-trifosfát (IP3) a na diacylglycerol (DAG). IP3 se šíří cytosolem a uvolňuje vápenaté ionty ( $\text{Ca}^{2+}$ ) z hladkého endoplazmatického retikula tím, že se naváže na vápenaté kanály v jeho membráně. DAG zůstává v plazmatické membráně a s pomocí  $\text{Ca}^{2+}$  aktivuje proteinkinázu C. Tato kináza dále aktivuje cílové enzymy podobně, jako tomu bylo v předchozí kaskádě, viz výše (Gäde a Auerswald, 2003).

Adipokinetické hormony ovšem nestimulují jen mobilizaci živin – jejich účinek je pleiotropní a ovlivňuje řadu procesů, které energetické krytí stresu účinně doplňují. Patří sem kontrola řady biochemických (aktivita enzymů) a fyziologických procesů (aktivita srdce, stimulace svalů a pohyb) (Gäde a kol., 1977).

Jak je již výše zmíněno, skupina AKH hormonů se řadí mezi nejlépe prozkoumané hormonální skupiny hmyzu. Nicméně prokázání a objasnění primární struktury AKH u včel (*A. mellifera*) předcházelo mnoho zmatků a nepřesných informací. Nakonec však v roce 2018 skupina Marchal a kol. dokázala primární strukturu AKH objasnit v podobě: – pGlu-Leu-Thr-Phe-Thr-Ser-Ser-Trp-Gly-NH<sub>2</sub>. Hormon se označuje jako Schgr-AKH-II, protože identická struktura byla již objasněna u saranče pustinné (*Schistocerca gregaria*). Nicméně podrobné funkce tohoto hormonu nejsou u včel podrobně prostudovány.

### 1.3 Modelový organismus – Včela medonosná (*Apis mellifera*)

Včelu medonosnou není třeba nějak podrobně představovat. Patří do blanokřídlého hmyzu (*Hymenoptera*) a řadíme ji do čeledi včelovitých. Do této čeledi spadá zhruba 12 tisíc různých zástupců. Podoba včely jako známe dnes se vyvinula zhruba před 15 miliony lety (Gruna a kol., 2016). Samotné včelstvo se skládá z jedné královny, mnoha dělnic (jejich přesný počet závisí na ročním období) a několika stovek trubců. Pro potřeby této diplomové práce uvádím, že včelí matka žije asi 3–5 let, trubec několik měsíců (od dubna do srpna) a včelí dělnice během vegetačního období asi 1 měsíc. Zajímavé jsou tzv. zimní včely, které přezimují, to znamená, že jsou v úlech od září zhruba do jara. Mechanismus této relativní dlouhověkosti není spolehlivě objasněn.

## 2 Cíle práce

Jak je uvedeno výše včelí jed je velmi zajímavá substance po teoretické i praktické stránce. V lékařské praxi se nabízí řada možných léčebných využití, jak přímo jedu, tak jeho složek. Aby k tomu mohlo docházet, je třeba o včelím jedu nashromáždit co nejvíce informací. Proto bylo cílem této práce monitorování obranných reakcí samotných včel po aplikaci včelího jedu. To zahrnovalo ověření hypotézy o předpokládaných změnách v hladinách následujících metabolitů:

1. Expres vitellogeninu v tukovém tělese u včelí dělnice a trubců.
2. Hladiny vitellogeninu v jednotlivých orgánech (hemolymfa, Malpighické trubice, střevo, tukové těleso) u včelí dělnice a trubce.
3. Hladiny biogenních aminů, konkrétně na dopaminu v jednotlivých včelích orgánech dělnice a trubce.
4. Hladiny adipokinetického hormonu v centrální nervové soustavě (CNS).

Tyto biochemické studie byly doplněny analýzami mikrostrukturálních změn ve svalových buňkách pomocí elektronového mikroskopu.

## 3 Materiály a metodika

### 3.1 Chov včely medonosné (*A. mellifera*)

Pokusní jedinci byli odebráni z pokusné včelnice Biologického centra AV ČR v Českých Budějovicích. Na všechny pokusy byli použiti trubci a dělnice neurčeného stáří během vegetačního období, tedy tzv. letní včely.

### 3.2 Aplikace včelího jedu

Včelí jed byl vpichován do včely in vivo v dávce 2  $\mu$ l surového jedu na jedince. Kontrolní skupina byla injikována stejnou dávkou Ringerova fyziologického roztoku. Poté byly včely drženy ve speciálních klíčkách při teplotě 38 °C a po 2 hodinách z nich byly vypitvány orgány na jednotlivá stanovení, jak je uvedeno níže.

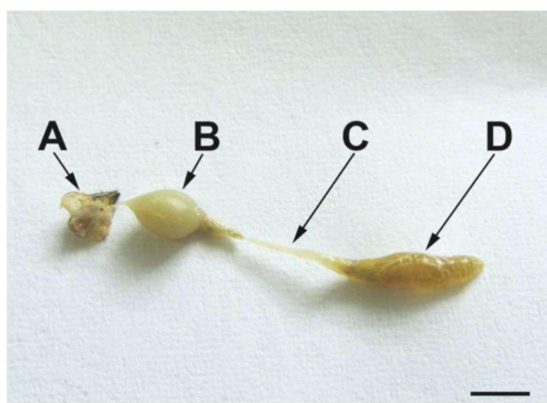
### 3.3 Odebírání hemolymfy

Pokusní jedinci byli narkotizováni pomocí CO<sub>2</sub>, aby došlo k jejich znehybnění. Poté u nich byla jehlou narušena kutikula a do vzniklé ranky přiložena mikro-kapilára, do které se nasála vytékající hemolymfa. Odebraný vzorek byl přemístěn do mikrozkušavky o objemu 2 ml. Zkušavku bylo nutno držet na ledu, aby nedošlo k melanizaci hemolymfy. Následně byly vzorky umístěny do mrazničky k dalšímu použití.

### 3.4 Pitva včelích orgánů

Samotná pitva jednotlivých orgánů (viz níže) probíhala pod binokulárním mikroskopem na voskové destičce s pomocí pitevních nůžek, pinzet a špendlíku.

Pitva byla zahájena odstřihnutím hlavové části, která byla připevněna k voskové destičce s Ringerovým fyziologickým roztokem. Z hlavy byl vypitván mozek spolu s endokrinním orgánem *corpora cardiaca*, vložen do mikrozkušavek (Eppendorf) a uložen do mrazničky (-18 °C) k dalšímu použití. Zbytek těla pokusného jedince byl přichycen dorzální stranou nahoru pomocí špendlíků. Kutikula byla rozstřížena pomocí nůžek a došlo k odebrání celého střeva (Obr. 2). Stejně bylo vypitváno tukové těleso, Malpighiho trubice a svaly. Orgány byly zváženy, a kromě svalů uloženy v mikrozkušavkách do mrazničky k dalšímu použití. Svaly byly vloženy do speciální fixáže (viz kap. 3.9).



Obr. 2. Vypitvané střevo včely medonosné. A. Žihadlový aparát, B. Rektální váček, C. Střední střevo, D. Přední střevo. (Dade, 2009).

### 3.5 Stanovení relativní hladiny vitellogeninu v jednotlivých orgánech pomocí ELISA

Reagencie:

- Aplikací pufr (CB) - smíchání 1,272 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 1,512 g  $\text{NaHCO}_3$  do 300ml destilované vody
- Mléko – Skim milk Powder (Sigma – Aldrich) – blocking buffer (1 g mléka do 20ml WB+)
- Promývací pufr ( $\text{WB}^+$ ) - pH 7,5, 10mM PBS (zásobní roztok, který je složen z  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , který je ředěn 1:9 na pracovní roztok) + 0,1 ml Tween/100 ml WB
- Primární protilátka proti včelímu Vg (připraveno u nás v laboratoři, (ředění 1:5000)
- Sekundární protilátka – Swine anti rabbit IgG/ HRP, (ředění 1:5000)
- Substrát Sigma T444, 3,3',5,5'- tetramethylbenzidene (SIGMA, SLCG1025)
- 0,5 M kyselina sírová (PENTA, 20450-12500)

#### a) Stanovení hladiny vitellogeninu v hemolymfě

Ekvivalent 0,01 $\mu\text{l}$  hemolymfy byl přidán do 100  $\mu\text{l}$  CB a následně byl tento objem přepipetován do 96-jamkové destičky; paralelně byl připraven i slepý vzorek (pouze 100  $\mu\text{l}$  CB). Destička byla zakryta ochranou folií, aby nedošlo ke kontaminaci vzorků a jejich odpařování. Takto připravená destička byla umístěna do chladničky (-18 °C) přes noc. Další den byla destička 3x promyta pomocí  $\text{WB}^+$ (200  $\mu\text{l}$ ). V dalším kroku byl do jamek napipetován blokovací roztok Skim milk Powder (200  $\mu\text{l}$ ) a destička byla inkubována 120 minut při 37 °C. Po uplynutí této doby byla destička znovu 3x promyta ( $\text{WB}^+$ ). Následně byla do každé jamky přidána primární protilátka proti včelímu vitellogeninu v množství 100  $\mu\text{l}$  (ředění 1:20000). Následovala inkubace při 37 °C po dobu 60 minut. Po uplynutí této doby došlo znovu k promytí destičky 200  $\mu\text{l}$   $\text{WB}^+$ . Po promytí byla do každé jamky napipetována sekundární protilátka – Swine anti



rabbit IgG/ HRP v množství 100  $\mu$ l na jamku (ředění 1:5000). Následovala další inkubace po dobu 60 minut při 37 °C a poté došlo k promytí destičky (6x) pomocí roztoku WB<sup>+</sup>. Posléze bylo do všech jamek přidáno 100  $\mu$ l substrátu Sigma T444, 3,3',5,5'-tetramethyl – benzidine a destička byla zabalena do alobalu a inkubována po dobu 40 minut (37 °C). V posledním kroku bylo přidáno 50  $\mu$ l 0,5 M kyseliny sírové, aby došlo k zastavení reakce. Hodnoty absorbance byly měřeny na ELISA čtečce (Obr. 3) při vlnové délce 450 nm.



Obr. 3. ELISA čtečka, BioTek Instruments 49984, Synergy 4, (vlastní fotografie).

#### b) Stanovení hladiny vitellogeninu ve vybraných orgánech

K vypitvaným orgánům bylo do zkumavky přidáno 100  $\mu$ l CB, vzorky byly rozsonikovány, centrifugovány a přepipetovány do 96- jamkové destičky. Následný postup byl stejný jako v kapitole 3.5.

### 3.6 Relativní exprese vitellogeninu v tukovém tělese

Reagencie:

- TRI Reagent T9424-25ML (Trisol) - Sigma – Aldrich
- Chloroform C2432-25ML – Sigma – Aldrich
- Isopropanol 583935- 1L – Sigma – Aldrich
- DEPC – treated H<sub>2</sub>O – Thermo Fisher Scientific
- SYBR MasterMix – Top Bio

### 3.6.1 Izolace RNA

V prvním kroku bylo tukové těleso včely pitváno do Trisolu (250  $\mu$ l), poté byly připravené vzorky homogenizovány pomocí ručního pístového homogenizátoru v laminárním boxu, aby nedošlo ke kontaminaci vzorků a zkumavky byly doplněny do objemu 1000  $\mu$ l dalším Trisolem. Následovalo promíchání vzorků a odstátí zhruba 5 minut v pokojové teplotě. Poté bylo přidáno 200  $\mu$ l chloroformu a následná centrifugace (15 minut, 12000 otáček, 4 °C). Po centrifugaci se oddělily 2 viditelné fáze. Vodná fáze byla odsáta do nových mikrozkuvek, a do nich bylo přidáno 500  $\mu$ l isopropanolu. Takto připravené vzorky byly inkubovány po dobu 24 hodin v mrazničce (-20 °C). Následující den byly vzorky opět centrifugovány (20 minut, 12000 otáček, 4 °C), supernatant byl odstraněn a ke vzniklému sedimentu, který zůstal na dně mikrozkuvek, bylo přidáno 500  $\mu$ l etanolu a vzorky byly opět centrifugovány (5 minut, 7500 otáček, 4 °C), posléze byl ethanol opatrně odstraněn a tento proces se opakoval znovu. Po druhé centrifugaci došlo k odstranění zbytku etanolu a vzorky byly ponechány na 5 minut při pokojové teplotě v digestoři, aby bylo odstranění etanolu kompletní. V dalším kroku byla izolovaná RNA rozpuštěna ve 30  $\mu$ l DEPC H<sub>2</sub>O a zkumavky byly řádně promíchány. Koncentrace a čistota izolované RNA byla vyhodnocena na NanoDrop spektrofotometru.

### 3.6.2 Reverzní transkripce

Vyizolovaná RNA (viz kap. 3.6.1) byla přepsána do cDNA pomocí kitu RevertAid kit (Thermo Scientific). RNA templát bylo nejdříve nutné přechistit od solí, ethanolu či iontů. Bylo postupováno dle protokolu od výrobce. Byl namíchan roztok (reagencie a množství jsou uvedeny v tabulce 1), který byl inkubován 30 minut při 37 °C. Následně byl přidán 1  $\mu$ l kyseliny ethylendiamintetraoctvé (EDTA) a inkubován dalších 10 minut při 65°C.

Tab. 1. Použité reagencie a množství na 1 reakci.

Reagencie	Objem
10x Reaction Buffer	1 $\mu$ l
DNase I, RNase free	1 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	7 $\mu$ l
RNA	1 $\mu$ g

Samotná směs pro reverzní transkripci se skládala z 10  $\mu$ l vody, 1  $\mu$ l RNA a primerů (použité primery byly syntetizovány firmou Generi – Biotech). Dále byly přidány reagencie uvedené

v tabulce 2. Tato směs byla promíchána, centrifugována a supernatant inkubován při 70 °C po dobu 5 minut. Izolovaná cDNA byla dále použita pro PCR amplifikaci.

Tab. 2. Použité množství na 1 reakci.

Reagencie	Objem (μl)
5x Reaction Buffer	4
RiboLock RNase Inhibitor (20U/ μl)	1
10 mM dNTP Mix	2
RevertAid RT (200U/μl)	1

### 3.6.3 Real time PCR

Ke každému vzorku cDNA bylo přidáno 200 μl dH<sub>2</sub>O a následně byly vzorky zamíchány a stočeny. Posléze byly k supernatantu přimíchány 3 μl směsi (7 μl 2x SYBR MasterMix, 3,3 μl dH<sub>2</sub>O, 0,35 μl primery). Genová exprese byla analyzována pomocí následujících primerů, viz tabulka 3. Vzorky byly měřeny v tripletech na 96-jamkové destičce (Bio-Rad), která byla zakryta speciální fólií (Microseal® C' Film, Bio-Rad) a podložkou z polytetrafluoroethylenu. Samotné měření probíhalo na CFX 1000 Touch Real – Time Cycler (Bio-Rad). Byl použit následující protokol:

- 95 °C 3 minuty
- 94 °C 15 vteřin denaturace
- 58 °C 20 vteřin zchlazení
- 72 °C 25 vteřin prodloužení

Data získaná z real time PCR byla analyzována pomocí programu Bio – Rad CFX Manager.

Tab. 3. Použité sekvence primerů

VG	Forward ATGGTCGACAATCCAGAATC Reverse GCTTCAACTTTTCTTCGCTC
RP49	Forward AAGTTCATTCGTCACCAGAG Reverse CTTCCAGTTCCTTGACATTATG

### 3.7 Měření aktivity katalázy

Aktivita katalázy byla měřena podle Amplex Red Catalase Assay Kit ve střevě modelového organismu. Samotná střeva byla vypitvána do zkumavek s 200  $\mu$ l reakčního pufru. Pro jednotlivá měření byla použita 1/8 střeva.

Obsah kitu:

- Amplex Red reagensie – komponent A
- DMSO (dimethylsulfoxid)– komponent B
- HRP – komponent C
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3 % (peroxid vodíku) - komponent D
- Reakční pufr (0,5M TRIS, pH- 7,5)
- Kataláza – komponent F

Reagensie:

- Amplex Red reagensie – 10mM Amplex Red – 0,26mg/100  $\mu$ l DMSO
- DMSO
- HRP–100 U/ml HRP rozpuštěním vialky C v 200  $\mu$ l reakčního pufru
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – 20mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>– 1  $\mu$ l 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> +42,5  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O  
– 40mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – 10  $\mu$ l 20mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> +4990  $\mu$ l reakčního pufru
- Reakční pufr – 4 ml 5x reakční pufr + 16 ml dH<sub>2</sub>O
- Kataláza – 1000 U/ml katalázy rozpuštěním obsahu vialky F ve 100  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O
- Vlastní vzorky - 1 střevo/200  $\mu$ l reakčního pufru

Postup:

Nejprve bylo potřeba připravit standardní kalibrační křivku podle návodu přiloženého výrobcem.

Poté následovalo napipetování standardní křivky a vlastních vzorků (extrakt střeva - 25  $\mu$ l na jamku) a slepého vzorku (50  $\mu$ l reakčního pufru) do 96- jamkové destičky. V následujícím kroku došlo k přidání 25  $\mu$ l 40mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mimo blank. Takto připravená destička byla inkubována ve tmě na 30 minut při pokojové teplotě. Po této inkubaci bylo do jamek napipetováno 50  $\mu$ l 100mM Amplex Red reagensie (4930  $\mu$ l reakčního pufru + 20  $\mu$ l U/ml HRP + 10mM Amplex Red) a znovu inkubováno na 30 minut, ale tentokrát při 37°C. V posledním kroku byly hodnoty absorbance změřeny na ELISA čtečce při 570 nm.

### 3.8 Biogenní aminy – dopamin

Včelí orgány byly připraveny stejným způsobem (viz kap. 3.4) a následně byly takto připravené vzorky lyofilizovány a poté uloženy do mrazničky (-80 °C) k následujícímu měření.

Samotná hladina dopaminu byla stanovena odborným pracovištěm – Ústav chemie a biochemie Mendelovy univerzity v Brně podle návodu (Bodláková a kol., 2022).

### 3.9 Transmisní elektronová mikroskopie (TEM)

Zpracování vzorků včelích svalů probíhalo v Laboratoři elektronové mikroskopie (Parazitologický ústav, Biologické centrum) a bylo prováděno Mgr. Šárkou Podlahovou a Mgr. Janem Černým.

Postup:

Vzorky včelích svalů (viz kap. 3.4) byly vypitvány a minimálně týden fixovány ve standardní fixáži: 2,5 % glutaraldehyd v 0,2 M fosfátovém roztoku při teplotě 4 °C. Pro vymytí primární fixáže byl použit roztok složený z 0,1 M pufru a 4 % glukózy; v něm byly vzorky promývány 3 x 20 minut. Poté byly vzorky ponořeny na 3 hodiny do vypíracího roztoku pufru a 4 % OsO<sub>4</sub> v poměru 1:1 pro sekundární fixaci. Posléze následovalo další promytí 3 x 20 minut. Dále byly vzorky odvodněny vzestupnou acetonovou řadou od 30 % do 100 % acetonu, každý po 20 minutách. Následovalo prosycení vzorků pomocí pryskyřice a 100 % acetonu v poměru 1:2, 1:1, a nakonec 2:1, každý na 2 hodiny. Posléze byly vzorky uchovány v čisté pryskyřici v exikátoru po dobu 24 hodin. Následující den byly vzorky znovu ponořeny do čisté pryskyřice na 2 hodiny. V následujícím kroku byly vzorky umístěny pomocí binokulární lupy do zalévacích forem. Samotná polymerizace pryskyřice proběhla při 62 °C po dobu 24 hodin. Takto připravený materiál byl nakrájen na poloténkové řezy pomocí ultramikrotomu (Leica EM UC6) a poté na ultratenké řezy. Poloténkové řezy byly barveny přímo na sklíčku pomocí toluidinové modře. Ultratenké řezy byly nakrájeny s použitím diamantového nože na ultramikrotomu (Leica EM UC6) a zachyceny ve vaničce s vodou. Zde pak byly nataženy pomocí par chloroformu. Z vodní hladiny byly řezy nasbírány na měděné sítky a posléze usušeny v Petriho misce vyložené filtračním papírem. Ultratenké řezy byly kontrastovány uranyl acetátem a citrátem olova a pak pouhlikovány v napařovací aparatuře. V posledním kroku byly takto připravené vzorky analyzovány na transmisním elektronovém mikroskopu JEOL – JEM - 1010.

### 3.10 Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)

#### Postup:

Vzorky včelích svalů (viz kap. 3.4) byly vypitvány a minimálně týden fixovány ve standardní fixáži: 2,5 % glutaraldehyd v 0,1M fosfátovém roztoku. Pro vymytí primární fixáže byl použit roztok složený z 0,1M pufru (3x 15 min.) Následovala postfixace 2 % OsO<sub>2</sub> v 0,1 M pufru (3-4hod.) a následovalo opětovné vymytí pomocí vymývacího roztoku (3x. 15 min.). Poté byly vzorky odvodněny pomocí vzestupné acetonové řady - (30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 100 %) po dobu 15 minut. Odvodněné vzorky bylo potřeba převést do amylacelátu (amylacetát + etanol – 1:2, 1:1, 2:1 po dobu 15 minut). Takto připravené vzorky byly vysušeny metodou kritického bodu pomocí CO<sub>2</sub> v přístroji CPD 030, kde došlo k zahřátí vzorků v kapalném CO<sub>2</sub>. Postupné zvyšování teploty CO<sub>2</sub>, až do jeho kritického bodu, vede k převedení CO<sub>2</sub> do plynného stavu a dojde k vysušení vzorku. V posledním kroku se takto připravené vzorky lepí na kovové terčíky a následně se pozlatí. Takto připravené vzorky byly pozorovány na rastrovacím elektronovém mikroskopu JEOL JSM-7401 F.

## 4 Výsledky

### 4.1 Vliv včelího jedu na mortalitu

Po aplikaci včelího jedu bylo potřeba nejprve sledovat mortalitu u jednotlivých pokusných skupin. Na Obr. 4 je možné pozorovat vyšší úmrtnost u skupin, které byly ošetřeny jedem, oproti skupinám, které byly ošetřeny pouze Ringerovým fyziologickým roztokem. Včelí jed několikanásobně stimuloval úmrtnost u dělnic i u trubců.



Obr. 4. Vliv injekce 2  $\mu$ l včelího jedu na mortalitu u včely medonosné za 2 hodiny po aplikaci. Statisticky významné rozdíly testované pomocí Studentova nepárového t – testu, jsou označeny \*\* na 1 % hladině významnosti, n=8.

### 4.2 Vliv včelího jedu na expresi vitellogeninu v tukovém tělese

V této části práce byl sledován vliv aplikace včelího jedu na expresi vitellogeninu, u kterého se přepokládá role v obranné reakci proti stresu, který byl jedem vyvolán. Na Obr. 5 můžeme pozorovat výsledky, které ukázaly, že aplikace jedu snižovala expresi vitellogeninu v tukovém tělese dělnic asi 2,2krát a u trubců byl zaznamenán podobný trend: aplikace jedu vyvolala asi 4,2násobné snížení vitellogeninové exprese oproti kontrole.

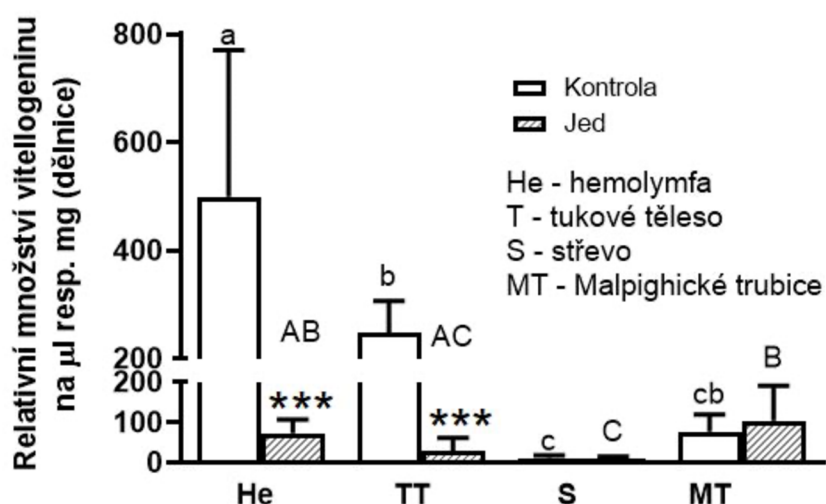


Obr. 5. Vliv injekce 2 µl včelího jedu na relativní expresi vitellogeninu u včely medonosné za 2 hodiny po aplikaci. Statisticky významné rozdíly testované pomocí Studentova nepárového t – testu jsou označeny \*\*\* na 0,1 % hladině významnosti a \*\* na 1 % hladině, n=8.

#### 4.3 Vliv včelího jedu na hladinu vitellogeninu v jednotlivých včelích orgánech

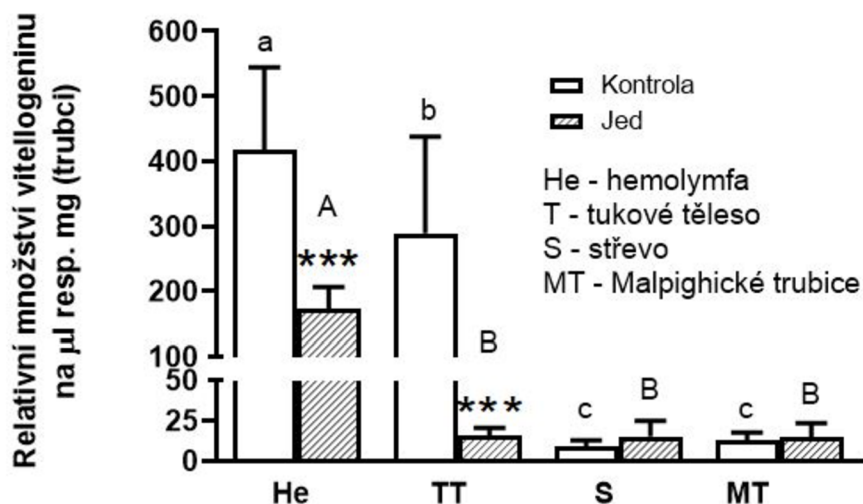
Hladina vitellogeninu může kolísat v závislosti na stavu organismu, který může být ovlivněn stresem, a proto bylo následně zkoumáno, jakým způsobem je včelí jed schopen ovlivnit množství vitellogeninu v orgánech včely medonosné. Na Obr. 6 můžeme pozorovat výsledky, které ukázaly, že aplikace jedu snižovala hladinu vitellogeninu v hemolymfě dělnic asi 6,8krát a v tukovém tělese došlo ke snížení hladiny až 8,6krát oproti kontrolní skupině. Ve střevě a v Malpighických trubicích nebyly pozorovány žádné statisticky významné rozdíly. Dále je z Obr. 6 patrné, že nejvyšší hladina vitellogeninu byla zaznamenána u kontrolní skupiny v hemolymfě a tukovém tělese, ve střevě a Malpighických trubicích byla tato hladina výrazně nižší. U skupiny, která byla ošetřena jedem byla pozorována velmi nízká hladina vitellogeninu ve všech sledovaných orgánech.





Obr. 6. Vliv injekce 2 µl včelího jedu na hladiny vitellogeninu v jednotlivých včelích orgánech (dělnice) 2 hodiny po aplikaci. Statisticky významné rozdíly mezi jedem ošetřenými orgány a příslušnými kontrolami testované pomocí Studentovo nepárového t – testu na 0,1 % hladině významnosti jsou označeny \*\*\*; statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými orgány testovány pomocí jednocestné analýzy variance (ANOVA) s Tukeyho post testem na 5 % hladině významnosti jsou označeny odlišnými písmeny nad sloupci (malými písmeny pro kontrolu a velkými písmeny pro ošetření jedem); n=8.

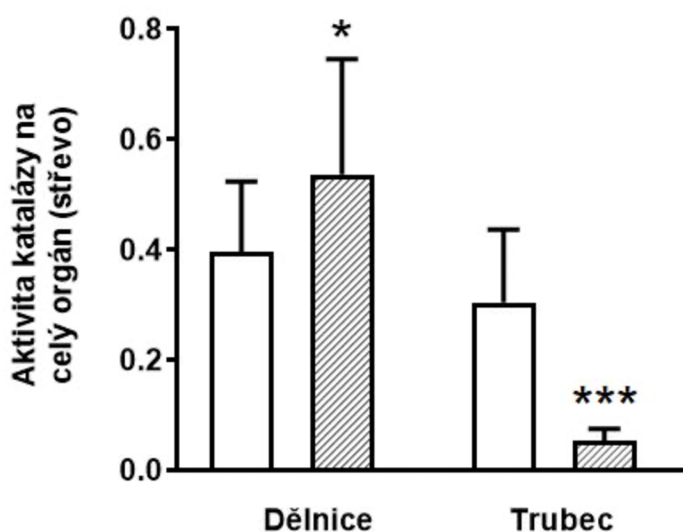
Obdobný dopad byl zjištěn i u trubců (Obr. 7), kde dávka jedu statisticky významně inhibovala hladinu vitellogeninu v hemolymfě a v tukovém tělese. Výsledky, ukázaly, že aplikace jedu snižovala hladinu vitellogeninu v hemolymfě trubců asi 2,4krát a v tukovém tělese došlo ke snížení hladiny až 18,4krát oproti kontrolní skupině. Ve střevě a v Malpighických trubicích nebyly pozorovány žádné statisticky významné rozdíly. Dále byly monitorovány rozdíly mezi jednotlivými orgány kontrolních skupin a mezi skupinami, které byly ošetřeny jedem. Nejvyšší hladiny vitellogeninu byly naměřeny opět v hemolymfě a v tukovém tělese kontrolních skupin a nízké hladiny ve střevě a v Malpighických trubicích. U skupiny ošetřené jedem byla hladina vitellogeninu v hemolymfě 8krát vyšší než v tukovém tělese, což bylo na rozdíl od dělnic statisticky významné. Rozdíly mezi hladinami vitellogeninu ve střevě a v Malpighických trubicích nebyly u ošetřených skupin statisticky průkazné.



Obr. 7. Vliv injekce 2 µl včelího jedu na hladiny vitellogeninu v jednotlivých včelích orgánech (trubci) za 2 hodiny po aplikaci. Statisticky významné rozdíly mezi jedem ošetřenými orgány a příslušnými kontrolami testované pomocí Studentovo nepárového t – testu na 0,1 % hladině významnosti jsou označeny \*\*\*; statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými orgány testovány pomocí jednocestné analýzy variance (ANOVA) s Tukeyho post testem na 5 % hladině významnosti jsou označeny odlišnými písmeny nad sloupci (malými písmeny pro kontrolu a velkými písmeny pro ošetření jedem); n=8.

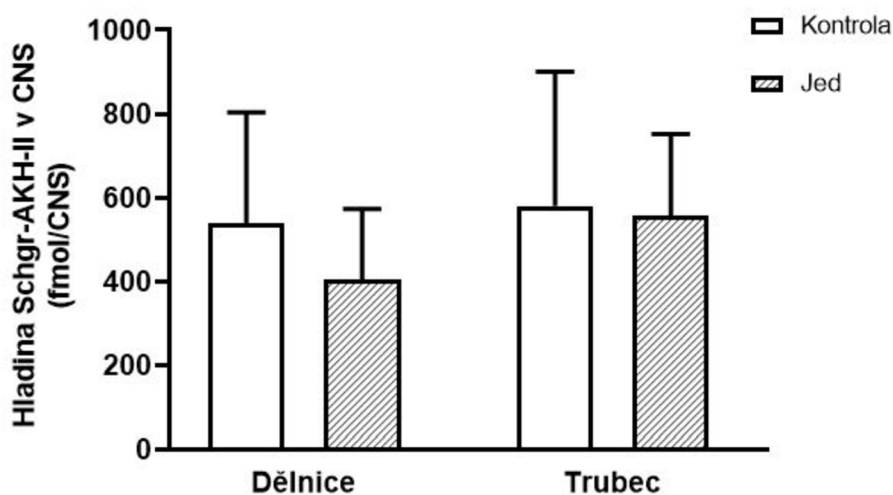
#### 4.4 Vliv včelího jedu na oxidační stres (kataláza)

V další části této práce byl sledován vliv včelího jedu na hladinu oxidačního stresu ve střevě včely medonosné – jako marker byla zvolena aktivita katalázy. Výsledky ukázaly, že ošetření dělnic včelím jedem vyvolalo 1,45krát vyšší aktivitu tohoto enzymu (Obr. 8). Je zajímavé, že u trubců byl pozorován opačný trend. Na Obr. 8 můžeme pozorovat inhibici aktivity katalázy asi 3,4krát oproti kontrolní skupině.



Obr. 8. Vliv injekce 2 µl včelího jedu na aktivitu katalázy ve střevě včely medonosné (dělnice a trubci) za 2 hodiny po aplikaci. Statisticky významné rozdíly testované pomocí Studentova nepárového t – testu, jsou označeny \* na 5 % hladině významnosti a \*\*\* na 0,1 % hladině, n=8.

V další části práce byl pozorován vliv injekce včelího jedu na hladinu adipokinetického hormonu (Schgr-AKH-II) v centrální nervové soustavě (CNS). Překvapivě je však z výsledků vidět, že tento stres způsobený jedem nevyvolal změny hladiny AKH v CNS u dělnic ani u trubců (Obr. 9).



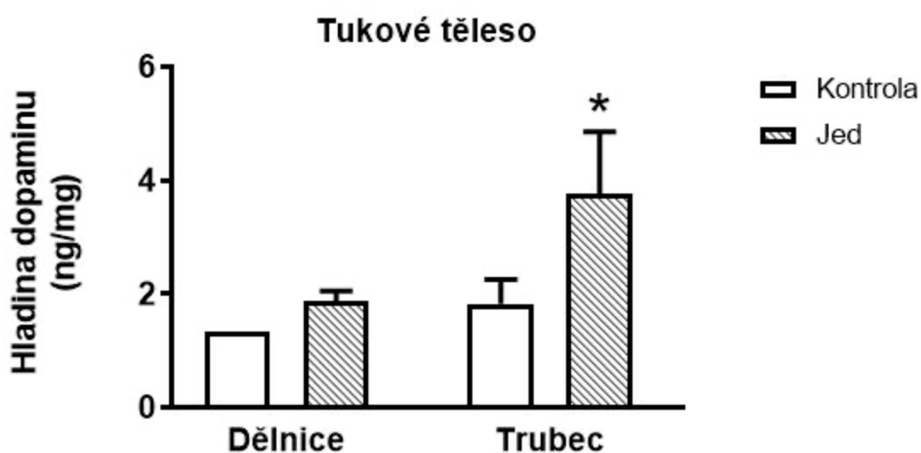
Obr. 9. Vliv injekce 2 µl včelího jedu na hladinu Schgr – AKH – II v centrální nervové soustavě (CNS) 2 hodiny po aplikaci, nebyl prokázán statisticky významný rozdíl na 5 % hladině významnosti, který byl testován pomocí Studentova nepárového t – testu, n=8.

#### 4.5 Účinek včelího jedu na hladinu dopaminu

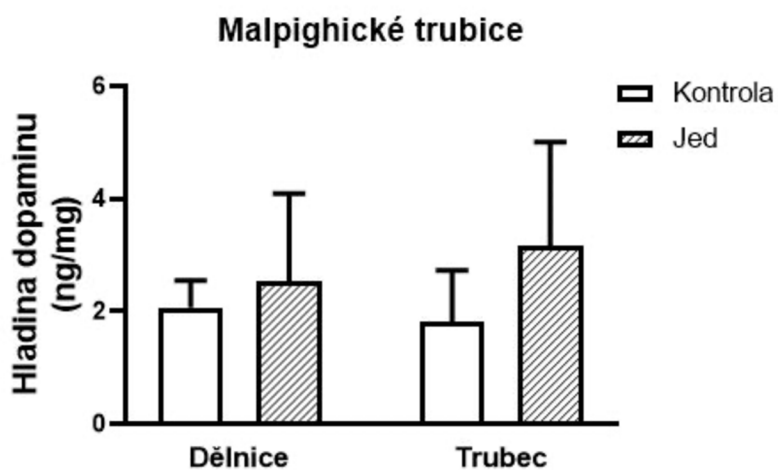
V této části práce byl sledován vliv působení včelího jedu na hladinu dopaminu v jednotlivých včelích orgánech (mozek, Malpighické trubice a tukové těleso). Ukázalo se, že hladina dopaminu byla po aplikaci včelího jedu stimulována v tukovém tělese trubců, u dělnic tento trend pozorován nebyl. Zdá se, že působení jedu stimuluje produkci dopaminu i v ostatních výše zmíněných orgánech, vzhledem k malému počtu opakování a technickým chybám nejsou výsledky statisticky průkazné (Obr. 10, 11, 12).



Obr. 10. Vliv injekce 2  $\mu$ l včelího jedu na hladinu dopaminu v mozku 2 hodiny po aplikaci, nebyl prokázán statisticky významný rozdíl na 5 % hladině významnosti, který byl testován pomocí Studentova nepárového t – testu, n=8.



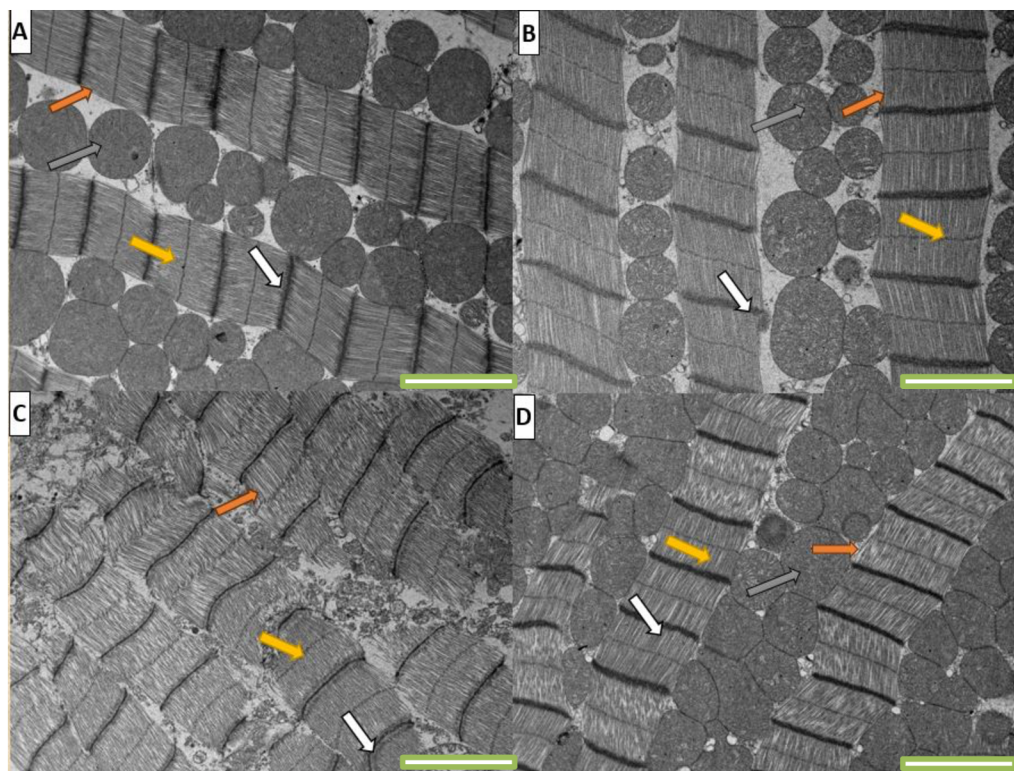
Obr. 11. Vliv injekce 2  $\mu$ l včelího jedu na hladinu dopaminu v tukovém tělese 2 hodiny po aplikaci, statisticky významné rozdíly testované pomocí Studentova nepárového t – testu, jsou označeny \* na 5 % hladině významnosti, n=8.



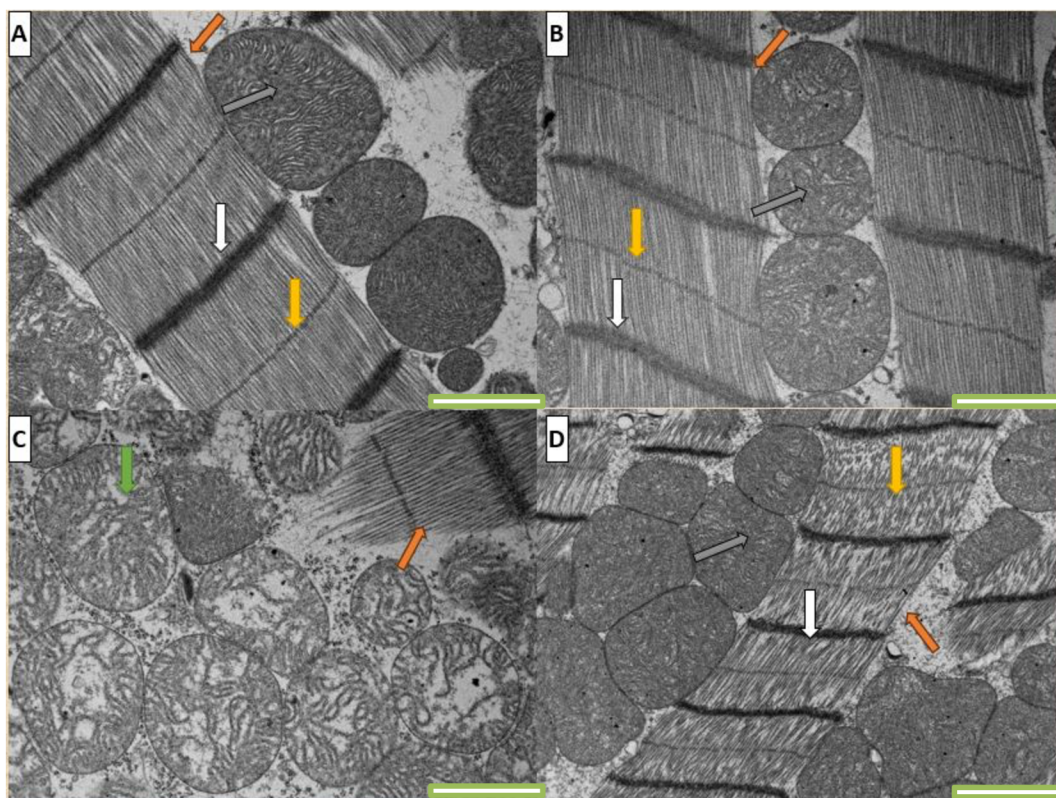
Obr. 12. Vliv injekce 2  $\mu$ l včelího jedu na hladinu dopaminu v Malpighických trubicích 2 hodiny po aplikaci, nebyl prokázán statisticky významný rozdíl na 5 % hladině významnosti, který byl testován pomocí Studentovo nepárového t – testu, n=8.

#### 4.6 Účinek včelího jedu na thorakální (létací) svalovinu

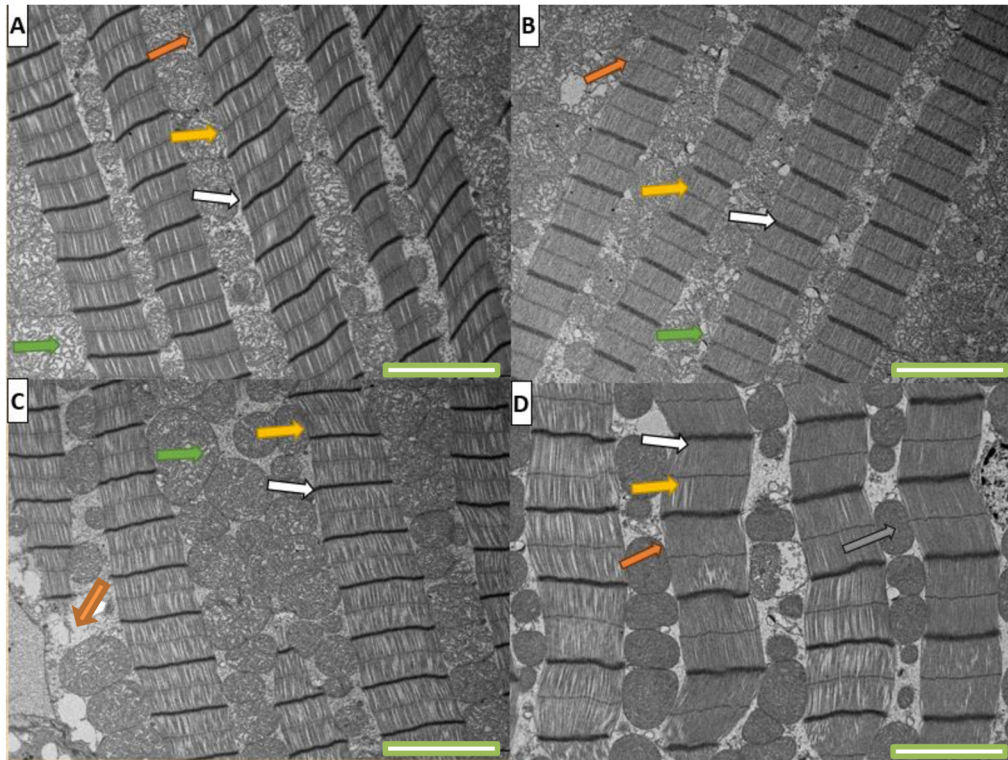
V další části práce byl sledován vliv působení včelího jedu na ultrastrukturu/strukturu svalové tkáně thoraxu včely medonosné. Analýza za pomoci transmisního elektronového mikroskopu (TEM) ukázala, že včelí jed způsobil poškození aktin-myozinového komplexu i vnitřní struktury mitochondrií u včelích dělnic (Obr. 13C,14C). Dále se ukázalo, že aplikace adipokinetického hormonu spolu s jodem, do značné míry eliminovala destrukční účinek jedu (Obr. 13D, 14D) a ultrastruktura svalových buněk byla podobná kontrolní skupině (Obr, 13A, 14A) nebo skupině ošetřené samotným adipokinetickým hormonem (Obr. 12B, 13B). Následně byla tato analýza provedena i u trubců (Obr. 15, 16). Výsledky pokusu však nebylo možné jednoznačně posoudit, protože ultrastruktura svalů vypadala hodně degenerovaná i u kontrolních jedinců. Je možné, že trubci použítí v pokusu už byli přestárlí a pozorované poškození mělo fyziologický charakter (dále viz Diskuze). Zdá se však, že ošetření AKH, ať už samotné (Obr. 15B, 16B) nebo v kombinaci s jodem (Obr. 15D, 16D) zlepšovalo strukturu myofibril.



Obr. 13. Vliv injekce 2  $\mu$ l včelího jedu a 2  $\mu$ l Schgr-AKH-II na ultrastrukturu thorakálních svalů dělnice včely medonosné (struktura myofibril) 2 hodiny po aplikaci: analýza pomocí TEM. (A) kontrolní skupina; (B) ošetření AKH; (C) ošetření jodem; (D) působení AKH + jedu. Bílá šipka – Z – linie; žlutá šipka – M – linie; zelená šipka – různě poškozené mitochondrie; oranžová šipka – myofibrily; šedá šipka – nepoškozené mitochondrie; (A, B, C, D) - měřítko - 2  $\mu$ m.

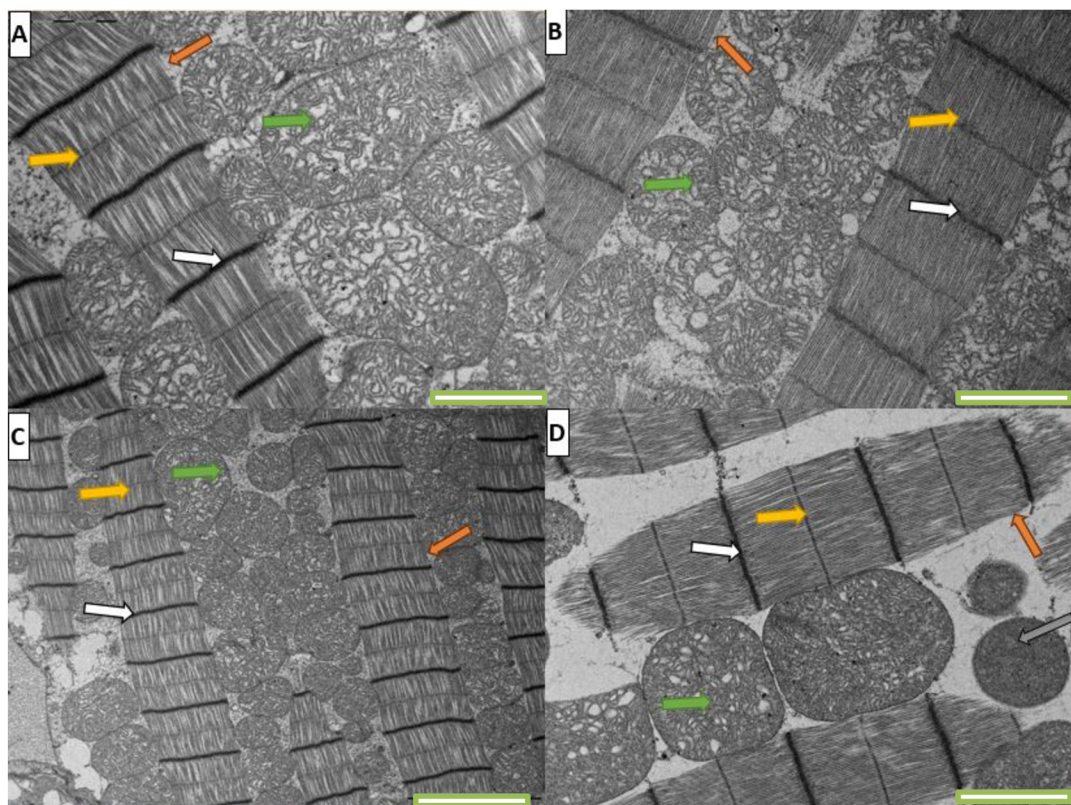


Obr. 14. Vliv injekce 2  $\mu$ l včelího jedu a 2  $\mu$ l Schgr-AKH-II na ultrastrukturu thorakálních svalů dělnice včely medonosné (struktura mitochondrií) 2 hodiny po aplikaci: analýza pomocí TEM. **(A)** kontrolní skupina; **(B)** ošetření AKH; **(C)** ošetření jedem; **(D)** působení AKH + jedu. Bílá šipka – Z – linie; žlutá šipka – M – linie; zelená šipka – různě poškozené mitochondrie; oranžová šipka – myofibrily; šedá šipka – nepoškozené mitochondrie; **(A, B)** - měřítko - 1  $\mu$ m, **(C, D)** – měřítko 2  $\mu$ m.



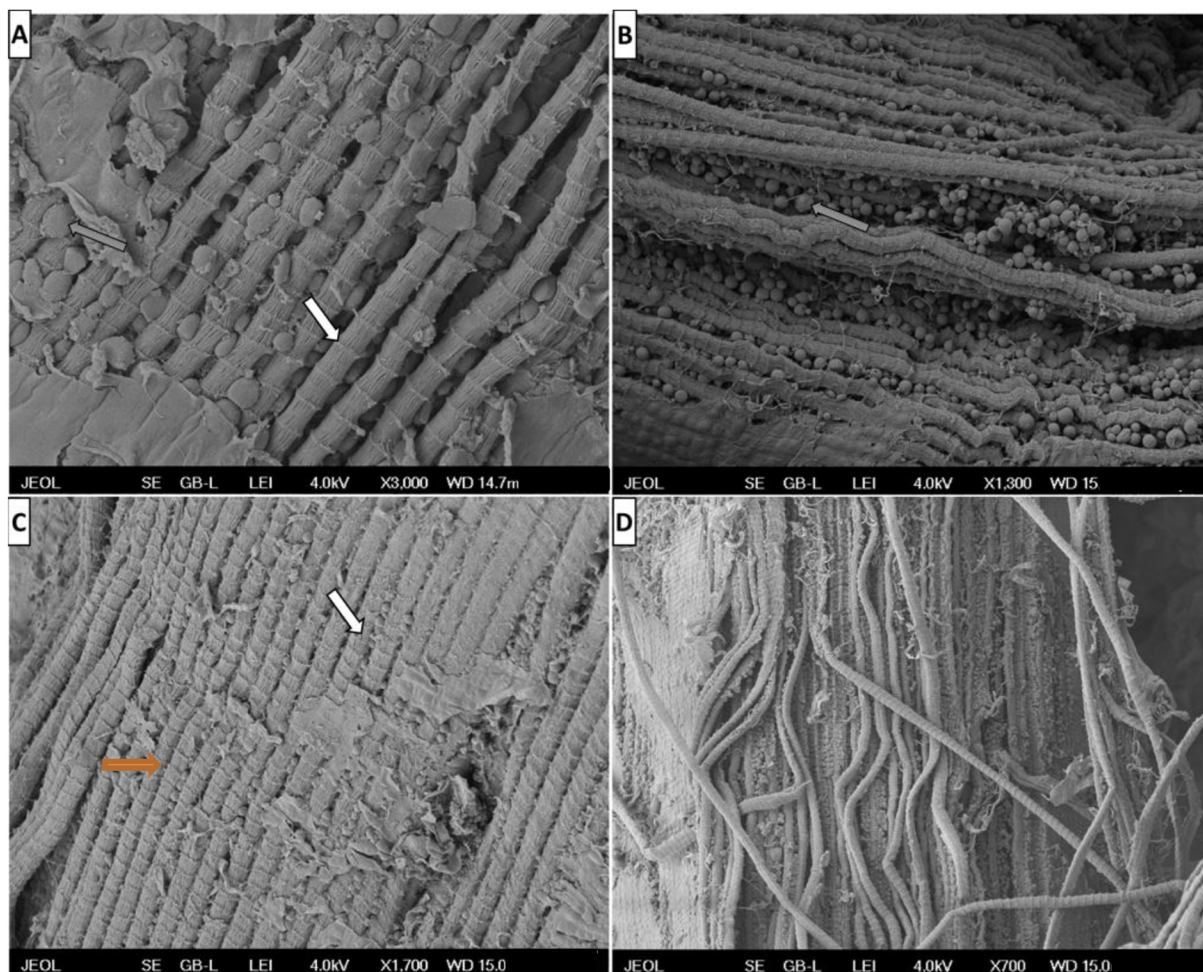
Obr. 15. Vliv injekce 2  $\mu\text{l}$  včelího jedu a 2  $\mu\text{l}$  Schgr-AKH-II na ultrastrukturu thorakálních svalů trubic (struktura myofibril) 2 hodiny po aplikaci: analýza pomocí TEM. (A) kontrolní skupina; (B) ošetření AKH; (C) ošetření jedem; (D) působení AKH + jedu. Bílá šipka – Z – linie; žlutá šipka – M – linie; zelená šipka – různě poškozené mitochondrie; oranžová šipka – myofibrily; šedá šipka – nepoškozené mitochondrie; (A, B, C) - měřítko - 5  $\mu\text{m}$ , (D) - měřítko – 2  $\mu\text{m}$ .





Obr. 16. Vliv injekce 2  $\mu\text{l}$  včelího jedu a 2  $\mu\text{l}$  Schgr-AKH-II na ultrastrukturu thorakálních svalů trubic (struktura mitochondrií) 2 hodiny po aplikaci: analýza pomocí TEM. (A) kontrolní skupina; (B) ošetření AKH; (C) ošetření jedem; (D) působení AKH + jedu. Bílá šipka – Z – linie; žlutá šipka – M – linie; zelená šipka – různě poškozené mitochondrie; oranžová šipka – myofibrily; šedá šipka – nepoškozené mitochondrie; (A, B, C) - měřítko - 2  $\mu\text{m}$ , (D) - měřítko – 5  $\mu\text{m}$ .

Kromě TEM analýzy byla struktura thorakálních svalů včely medonosné analyzována pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM). Výsledky ukázaly, že včelí jed nezpůsobil viditelné poškození povrchů myofibril ani kulovitých útvarů (nejspíše mitochondrie) u včelích trubic (Obr. 17).



Obr. 17. Vliv injekce 2  $\mu$ l včelího jedu na strukturu thorakálních svalů trubiců – myofibrily a kulovité útvary (nejspíše mitochondrie) 2 hodiny po aplikaci jedu: analýza pomocí SEM. (A, B) – kontrolní skupina; (C, D) – ošetření jedem. Šedá šipka – kulovité útvary (nejspíše mitochondrie), bílá šipka – Z – linie, oranžová šipka – myofibrily (A) - měřítko - 1  $\mu$ m, (B) - 10  $\mu$ m, (C) - 10  $\mu$ m, (D) - 10  $\mu$ m.

## 5 Diskuze

Z výsledků této práce je zřejmé, že včelí jed působí i na jedince vlastního druhu a vyvolává v jejich těle zajímavé fyziologické a biochemické změny. Ovlivňuje především hladinu vitellogeninu – způsobuje pokles exprese jeho genu v tukovém tělese i pokles jeho hladiny v hemolymfě i tukovém tělese. Přítomnost vitellogeninu byla prokázána i v jiných orgánech včel (střevo, Malpighické trubice), nicméně tato hladina byla velmi nízká a nehrála v celkovém vitellogeninovém metabolismu podstatnou roli. Vitellogeniny hrají především důležitou roli při vitellogenezi, což je proces, při kterém dochází k transportu živin a energie do oocytů v podobě žloutku. Nicméně vitellogeniny hrají důležitou roli i v hmyzí imunitě nebo při ochraně před oxidačním stresem. Zajímavý trend byl pozorován u ruměnice pospolné *Pyrrhocoris apterus*, která byla infikována hlísticí *Steinernema carpocapsea*. U samců této ploštiny bylo po infekci pozorováno zvýšení exprese vitellogeninu i hladina vitellogeninu v tukovém tělese. U samic, které mají hladinu vitellogeninu mnohem vyšší než samci, byl pozorován opačný trend: hladina vitellogeninu i exprese jeho genu byla po infekci v tukovém tělese inhibována. Pravděpodobným vysvětlením této skutečnosti je fakt, že zvládnutí samotné infekce vyžaduje jistou optimální hladinu vitellogeninu, a aby jí samci dosáhli musí hladinu vitellogeninu zvýšit. Samice pak snížením hladiny vitellogeninu zamezují plýtvání energií, kterou si „šetří“ na jiné aktivity jako je třeba překonání dané stresové situace jinými prostředky (Kodrík a kol., 2019). Podobná situace byla zjištěna i u mandelinky bramborové *Leptinotarsa decemlineata* (Hlávková a kol., 2022). V mé práci bylo zaznamenáno snížení hladiny vitellogeninu po ošetření jedem jak u dělnic, tak u trubců. Situace u dělnic odpovídá výše popsané situaci; proč ale k poklesu vitellogeninové hladiny došlo i u trubců, kteří se tak liší od samců ostatních sledovaných hmyzích druhů (Kodrík a kol., 2019; Hlávková a kol., 2022), není zcela jasné. Možná v tom hraje roli přece jen odlišný způsob života trubců od samců jiných druhů hmyzu. Všechny tyto práce však jasně naznačují, že existuje korelace mezi vitellogeninem a stresem vyvolaným infekcí anebo intoxikací těla. Nicméně pro plné porozumění jeho funkce v těchto reakcích je potřeba tuto skutečnost dále zkoumat.

Včelí jed je známý také jako agens vyvolávající oxidační stres (Nguyen a kol., 2022), který je způsoben především nerovnováhou mezi produkcí a eliminací reaktivních kyslíkových metabolitů. Je zajímavé, že v mé práci byla pozorována opačná tendence aktivity katalázy u dělnic a u trubců po ošetření jedem. U dělnic byla aktivita katalázy signifikantně stimulována, ale u trubců inhibována. Je možné, že trubci nemají dostatečnou schopnost obrany vůči oxidačním stresorům jako tomu je u dělnic. Žijí totiž jen relativně krátce v bezpečném prostředí

včelího úlu kvůli oplození matky, a poté jejich úloha končí. Naopak u aktivních dělnic je nutnost obrany vůči oxidačnímu stresu mnohem důležitější. Je zajímavé, že u švába amerického *Periplaneta americana* aplikace včelího jedu nevyvolala akutní stav oxidačního stresu (Bodláková a kol., 2022), což naznačuje, že dopad jedu na hmyzí organismus může být druhově specifický.

V další fázi této práce byl sledován vliv jedu na hladinu adipokinetického hormonu (Schgr-AKH-II) v centrální nervové soustavě (CNS) včel. Ve své bakalářské práci (Kainzová, 2021) jsem zjistila, že dávky jedu 0,35  $\mu$ l, 0,7  $\mu$ l a 1,4  $\mu$ l vyvolaly po 24 hodinách až 5násobné snížení této hladiny u včelích dělnic. Pravděpodobným vysvětlením tohoto snížení mohlo být uvolnění AKH do hemolymfy a jeho následné transportování do cílových orgánů. V této práci byla dávka jedu zvýšena na 2  $\mu$ l a doba jeho působení zkrácena na 2 hodiny – po této době však nebyl u hladiny AKH v CNS prokázán žádný statisticky významný rozdíl. Doba 2 hodiny je zřejmě příliš krátká doba na to, aby bylo zaznamenáno zvýšení syntézy AKH. Nicméně hladina AKH reaguje na stresové situace variabilně, například u švába amerického *P. americana* včelí jed zvýšil hladinu AKH v CNS i v hemolymfě (Bodláková a kol., 2022). Podobný výsledek byl zaznamenán i u ruměnice pospolné *P. apterus*, kde byla monitorována hladina AKH v CNS a v hemolymfě po 6 a 24 hodinách. Včelí jed vyvolal asi dvojnásobné zvýšení hladiny v CNS, a naopak asi trojnásobné snížení hladiny AKH v hemolymfě 24 hodin po aplikaci jedu. Po 6 hodinách byla hladina AKH v obou případech prakticky beze změn (Ondřichová, 2023). Tyto výsledky jasně ukazují zapojení AKH do aktivace obranných mechanismů proti stresové zátěži. Lze předpokládat, že včelí jed a s ním vyvolaný stres vyvolá kolísání hladiny i u biogenních aminů. Biogenní aminy řadíme mezi nezbytně důležité látky pro všechny živé organismy. Jsou to dusíkaté látky, které fungují jako neurotransmitery, neuromodulátory nebo neurohormony. V molekule mají jednu nebo více aminových skupin pocházející z dekarboxylace aminokyselin. U hmyzu je možné najít dopamin, serotonin, histamin, oktopamin nebo tyramin (Resh, 2004). V práci Bodláková a kol. (2022) byla hladina dopaminu u švába amerického po aplikaci včelího jedu mírně stimulována, ale výsledky se neukázaly jako průkazné. V mé práci byla studována hladina dopaminu v jednotlivých včelích orgánech (mozek, tukové těleso, Malpighické trubice). V tukovém tělese bylo možné pozorovat zvýšení hladiny dopaminu u trubců a částečně i u dělnic (kde však bylo neprůkazné). Kolísání hladiny dopaminu po intoxikaci včel není zcela prozkoumáno, ale je možné, že ke zvýšení hladiny dopaminu dochází především v metabolicky aktivních orgánech (tukové těleso). Je škoda, že kvůli technickým chybám při měření dopaminu

nebyly výsledky u dělnic statisticky průkazné. V dalších použitých orgánech byla pozorována mírná/nesignifikantní stimulace hladiny dopaminu.

Již delší dobu je známo, že včelí jed může způsobovat velice vážné poškození svalových vláken, které může vést až k myonekróze (Betten a kol., 2006; Florea a kol., 2018). Ve studii Florea a kol. (2018) byla u myši pozorována a analyzována ultrastruktura kosterního svalstva po aplikaci včelího jedu. V místě vpichu došlo k tvorbě nekrózy a lokálního zánětu a po vyšší dávce jedu došlo k myodegeneraci, a dokonce myonekróze svalových vláken. Aplikace samostatných včelích toxinů (melitin, fosfolipáza) vedla také ke značné destrukci svalových vláken. K rozsáhlé destrukci došlo i po aplikaci včelího jedu (0,5  $\mu$ l) u švába amerického *P. americana* po 24 hodinách. Podobný účinek byl pozorován i po aplikaci včelího jedu na buňky kosterního svalstva člověka (Fletcher a kol., 1996). Není proto překvapivé, že v mé práci analýza za pomoci transmisního elektronového mikroskopu (TEM) ukázala, že včelí jed způsobil poškození aktin-myozinového komplexu i vnitřní struktury mitochondrií u včelích dělnic. U trubců bylo podobné posouzení vlivu jedu na ultrastrukturu svalů obtížné, protože bylo zaznamenáno značné poškození mitochondrií i u kontrolní skupiny. To lze snad vysvětlit tím, že byli nejspíše pro samotné pokusy použiti příliš staří trubci, kteří již měli svalová vlákna značně poškozená.

Dále se v mé práci ukázalo, že aplikace adipokinetického hormonu spolu s jedem do značné míry eliminovala destrukční účinek jedu a ultrastruktura svalových buněk byla podobná kontrolní skupině anebo skupině ošetřené samotným AKH. U obou skupin (dělnic i trubců) se ukázalo, že aplikace adipokinetického hormonu má na ultrastrukturu svalových buněk velmi pozitivní vliv. Podobný výsledek byl monitorován u švába amerického *P. americana*, kde aplikace adipokinetického hormonu zabránila rozsáhlému poškození svalových vláken (Bodláková a kol., 2022), jako tomu bylo v mé práci. Je potřeba tuto problematiku dále studovat, a přestože přesný mechanismus účinku není znám, může být zprostředkovan stimulacním účinkem AKH na imunitní systém.

## 6 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo sledování fyziologických procesů probíhajících v těle včely medonosné *A. mellifera* po aplikaci včelího jedu. Bylo zjištěno následující:

1. Exprese vitellogeninu v tukovém tělese dělnic i trubců byla 2 hodiny po aplikaci včelího jedu inhibována.
2. Hladina vitellogeninu byla inhibována v tukovém tělese a hemolymfě; naopak v Malpighických trubicích a střevě nebyla hladina vitellogeninu výrazně změněna.
3. Aktivita katalázy byla po aplikaci jedu u dělnic stimulována a u trubců naopak inhibována.
4. Hladina adipokinetického hormonu v centrální nervové soustavě nevykazovala žádný statisticky průkazný rozdíl mezi kontrolní a jedem ošetřenou skupinou.
5. Hladina dopaminu v tukovém tělese trubců byla po aplikaci včelího jedu zvýšena. V tukovém tělese (dělnic), mozku a Malpighických trubicích (obou skupin) byla hladina mírně zvýšena, ale rozdíly nebyly statisticky průkazné.
6. Thorakální svaly byly jedem značně poškozeny u dělnic. U trubců došlo k poškození i u kontrolní skupiny, což nejspíše způsobilo stáří pokusných jedinců. Adipokinetický hormon aplikovaný současně s jedem eliminoval/omezil destrukční účinek jedu u obou monitorovaných skupin.

## 7 Seznam použité literatury

Amdam, G. V., Aase, A. L., Seehuus, S. C., Kim, M., Fondrk, M., Norberg, K., Hartfelder, K. *Social reversal of immunosenescence in honey bee workers*. *Experimental Gerontology*, 2005, 40(12):939-47.

Baek, H., Lee, C., Choi, D. B., Kim, N., Kim, Y. S., Ye, Y. J., Kim, Y. S., Kim, J. S., Shim, I., Bae, H. *Bee venom phospholipase A2 ameliorates Alzheimer's disease pathology in Aβ vaccination treatment without inducing neuro-inflammation in a 3xTg-AD mouse model*. *Scientific Reports*, 8(1), 2018, 17369.

Baltacıoğlu, E., Yuva, P., Aydın, G., Alver, A., Kahraman, C., Karabulut, E., Akalın, F. A. *Lipid peroxidation levels and total oxidant/antioxidant status in serum and saliva from patients with chronic and aggressive periodontitis. Oxidative stress index: a new biomarker for periodontal disease?* *Journal of Periodontology*, 2014, 85(10):1432-41.

Beckman, K. B., Ames, B. N. (1998). *The free radical theory of aging matures*. *Physiology Review*, 78(2):547-81.

Bednářová, A., Kodrík, D., Krishnan, N. *Adipokinetic hormone exerts its anti-oxidative effects using a conserved signal-transduction mechanism involving both PKC and cAMP by mobilizing extra – and intracellular Ca<sup>2+</sup> stores*. *Comparative Biochemistry and Physiology and Toxicology Pharmacology*, 2013, 158(3):142-9.

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

Blank, S. *Vitellogenins Are New High Molecular Weight Components and Allergens (Api m 12 and Ves v 6) of Apis mellifera and Vesputula vulgaris Venom*. Online. *PLoS One*, 2013, e62009.

Bodláková, K. *Hormonálně řízená obrana proti hmyzím patogenům*. Bakalářská práce (Bc.), 2020, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. Přírodovědecká fakulta.

BodlÁková, K., Černý, J., GurÁň, R., Štěřbová, H., Zítka, O., Kodřík, D. *Insect Body Defence Reactions against Bee Venom: Do Adipokinetic Hormones Play a Role?* Toxins, 2022, 18.

body of a mosquito: an ultrastructural and immunocytochemical study. *Tissue Cell*, 1983, 15:281-99.

Bogdanov, S. *Bee venom: production, composition, quality*. In: *The bee venom book*. Muehlethurnen, 2016, Switzerland. [www.bee-hexagon-net](http://www.bee-hexagon-net).

Candy, D. J. *Adipokinetic hormones concentrations in the haemolymph of Schistocerca gregaria measured by radioimmunoassay*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2002, 32, 1361–1367.

Collison, A. *Closer Look: Venom/Venom Glands*. Bee Culture, 2015.

Cremer, S., Armitage, S. A. O., Schmid-Hempel, P. *Social immunity*. *Current Biology* 16, 2007, R693-R702.

Dade, H. A. (2009). *Anatomy and dissection of the honey bee*. International Bee Research Association, 196.

Demeter, Š. *Apiterapie: léčení včelími produkty*. Druhé české upravené vydání. Přeložil A. Lenočová. Olomouc: Jaroslav Čadra, 2021. ISBN 978-80-87274-63-7.

Denlinger, D. L. *Insect diapause*. New York, 2022, NY: Cambridge University Press.

Durham, S. R., Walker, S. M., Varga, E. M., Jacobson, M. R., O'Brien, F., Noble, W., Till, S. J., Hamid, Q. A., Nouri-Aria, K. T. *Long-term clinical efficacy of grass-pollen immunotherapy*. *The New England Journal of Medicine*, 1999, 341(7), 468–475.

Fletcher, J. E., Hubert, M., Wieland, S. J., Gong, O. H., Jiang, M. S. *Similarities and differences in mechanisms of cardiotoxins, melittin and other myotoxins*. *Toxicon* 1996, 34, 1301–13011.



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

Fridovich, I. *The biology of oxygen radicals*. Science, 1978, 8;201(4359):875-80.

Gäde, G., Auerswald, L. *Mode of action of neuropeptides from the adipokinetic hormone family*. General of Comparative Endocrinology, 2003, 1;132(1):10-20.

Gäde, G., Hoffmann, K. H., Spring, J. H. *Hormonal regulation in insects: facts, gaps and future directions*. Physiological Reviews 77, 1997, 963–1032.

Golden, D. B. K. *Insect sting allergy and venom immunotherapy: A model and a mystery*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2005, 115(3), 439–447.

Gruna, B., Počuch, M., Přidal, A., Lstibůrek, J. (2016). Včelařství. České Budějovice: PSNV. ISBN 978-80-270-0776-9.

Habermann, V. *Lékařská chemie*. Praha. Karolinum, 2011, ISBN 978-80-246-1991-0.

Hanson, J. M., Morley, J., Billingham, J. *Anti-inflammatory property of 401 (MCD-peptide), a peptide from the venom of the bee Apis mellifera (L.)*. British Journal of Pharmacology, 50(3), 1974, 383–392. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1974.tb09613.x>.

Havukainen, H., Münch, D., Baumann, A., Zhong, S., Halskau, Ø., Krogsgaard, M., Amdam, G.V. *Vitellogenin recognizes cell damage through membrane binding and shields living cells from reactive oxygen species*. Journal of Biological Chemistry, 2013, 288(39):28369-81.

Hlávková, D., Skoková, Habušťová, O., Půža, V., Vinokurov, K., Kodrík, D. *Role of adipokinetic hormone in the Colorado potato beetle, Leptinotarsa decemlineata infected with the entomopathogenic nematode Steinernema carpocapsae*. Comparative Biochemistry and Physiology, 2022; 262:109466.

Hossen, M. S., Shapla, U. M., Gan, S. H., Khalil, M. I. *Impact of Bee Venom Enzymes on Diseases and Immune Responses*. *Molecules* 22, 2017, 25. <https://doi.org/10.3390/molecules22010025>.

Hossen, M. T., Sohag, M. A. S., Monjil, M. S. *Comparative Efficacy of Garlic, BAU-Biofungicide, Bavistin and Tilt on Seed Borne Fungal Flora in Chilli*. *Bangladesh Journal of Agricultural University*, 15, 2017, 41-46.

Hrdina, V., Hrdina, J., Jahodář, L., Martinec, V. *Přírodní toxiny a jedy*. Praha: Karolinum, 2004, ISBN 80-246-0823-5.

Chai, L., Yang, X., Liu, M., Liu, C., Han, L., Guo, H., Li, C., Sun, Y., Li, X., Xiao, M. *Biopanning of allergens from wasp sting patients*. *Bioscientific Reports*, 38, 2018, BSR20181113.

Chapman, R. F. *The insects: Structure and function*. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1998, ISBN: 9780511818202.

Jasani, B., Kreil, G., Mackler, B. F., Stanworth, D. R. *Further studies on the structural requirements for polypeptide-mediated histamine release from rat mast cells*. *Biochemical Journal*, 181(3), 1979, 623–632.

Jeong, Y. J., Cho, H. J., Whang, K., Lee, I. S., Park, K. K., Choe, J. Y., Han, S. M., Kim, C. H., Chang, H. W., Moon, S. K., Kim, W. J., Choi, Y. H., Chang, Y. C. *Melittin has an inhibitory effect on TNF- $\alpha$ -induced migration of human aortic smooth muscle cells by blocking the MMP-9 expression*. *Food and Chemical Toxicology*, 2012, 50(11), 3996–4002.

Kainzová, Klára. *Vliv přírodních toxinů na včelu medonosnou*. Diplomová práce (Mgr), České Budějovice: Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita, 2021.

Kamler, F., Oliva, Z., Ptáček, V. *Nástavkové včelaření*. TiNa Olomouc, 1998, 69 p.

Kato, M. *Caste-specific and age-related toxic activities of honeybee venom on the same species of honeybees*. Honeybee Science 15, 1994, 119-122.

Kodrík, D. Adipokinetic hormone functions that are not associated with insect flight. Physiological Entomology 33, 2008, 171-180.

Kodrík, D., Bednářová, A., Zemanová, M., Krishnan, N. *Hormonal Regulation of Response to Oxidative Stress in Insects-An Update*. International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16(10):25788-816.

Kodrík, D., Ibrahim, E., Gautam, U. K., Čapková-Frydrychová, R., Bednářová, A., Krišťůfek, V., Jedlička, P. *Changes in vitellogenin expression caused by nematodal and fungal infections in insects*. Journal of Experimental Biology, 2019; 222: jeb202853.

Kumar, N. V. *Structure of P401 (mast cell degranulating peptide) in solution*. Online. Biophysical chemistry, 31,1988, 1-2.

Lamy, C., Goodchild, S. J., Weatherall, K. L., Jane, D. E., Liégeois, J. F., Seutin, V., Marrion, N. V. *Allosteric block of KCa2 channels by apamin*. The Journal of Biological Chemistry, 2010, 285(35), 27067–27077.

Lushchak, V. *Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals*. Online. Aquatic Toxicology, 2011, 101:13–30.

Marchal, E., Schellens, S., Monjon, E., Bruyninckx, E., Marco, H. G., Gäde, G., Vanden Broeck, J., Verlinden, H. *Analysis of Peptide Ligand Specificity of Different Insect Adipokinetic Hormone Receptors*. International Journal of Molecular Sciences 19, 2018, 542.

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

Ondřichová, A., Štěrbová, H., Danihlík, J., Jemelková, J., Hejníková, M., Kodrík, D. *Physiological responses to honeybee venom poisoning in a model organism, the firebug *Pyrrhocoris apterus**. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 2023, 270, 109657.

Park, J. H., Kim, K. H., Kim, S. J., Lee, W. R., Lee, K. G., Park, J. H., Park, K. K. *Effect of bee venom on transforming growth factor-beta1-treated hepatocytes*. *International Journal of Toxicology*, 2010, 29(1), 49–56.

Patočka, J. *Vojenská toxikologie*. Praha: Grada Publishing, 2004, ISBN 80-247-06083.

Pease, J., Wemer, K. *Solution structure of apamin determined by nuclear magnetic resonance and distance geometry*. Online, *Biochemistry*, 1988.

Resh, H. V., Carde, R. T. *Encyclopedia of Insects*. Elsevier Books, 2004, ISBN 01-237-4144-0.

Salmela, H., Amdam, G. V., Freitak, D. *Transfer of immunity from mother to offspring is mediated via egg-yolk protein vitellogenin*. *PLoS Pathogens* 11, 2015, e1005015.

Singh, N. K., Pakkianathan, B. C., Kumar, M., Prasad, T., Kannan, M., König, S., Krishnan, M. (2013). *Vitellogenin from the silkworm, *Bombyx mori*: an effective anti-bacterial agent*. *PLoS ONE*, 2013, 8, e73005.

Spurný, J. *Vliv jednotlivých složek včelího jedu na lidský organismus*. Bakalářská práce, Praha, 2021, Univerzita Karlova Přírodovědecká fakulta.

Titěra, D. *Včelí produkty mýtů zbavené: med, vosk, pyl, mateří kašička, propolis, včelí jed*. Brázda, 2006, ISBN 80-209-0347-x.

Veselý a kol. *Včelařství*. Brázda, 2003, ISBN 80–209-0320-8.

Weyda, F., Kodrík, D. *New functionally ultrastructural details of the honey bee stinger tip: serrated edge and pitted surface. Journal of Apicultural Research*, 2020, DOI: 10.1080/00218839.2020.1837545.

Ziai, M. R., Russek, S., Wang, H. C., Beer, B., Blume, A. J. *Mast Cell Degranulating Peptide: A Multi-functional Neurotoxin. Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 42(7), 1990, 457–461.