

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Vliv přírodních toxinů na včelu medonosnou

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: Klára Kainzová

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

Místo a rok vydání: České Budějovice, 2021

Kainzová, K., 2021: Vliv přírodních toxinů na včelu medonosnou. [The effect of natural toxins on honeybee *Apis mellifera* L. Bachelor thesis, in Czech] – 31. p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

The aim of this bachelor thesis was to describe the effect of honeybee venom on the activity of digestive enzymes (amylases, proteases, lipases), AKHs production in CNS, and level of nutrients (lipids, proteins, glycodes) and vitellogenin in haemolymph of the honeybee *Apis mellifera* workers. Crude venom was applied into the honeybee body 24 hours before determination of the above mentioned characteristics. Results showed that the bee venom reduced the AKH level in CNS, increased activity of digestive enzymes in gut, and increased level of vitellogenin in haemolymph. Effect of the venom on nutrient level in haemolymph was variable – level of lipids and carbohydrates was enhanced, while level of proteins reduced.

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně, pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění, souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG, provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz, provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, dne 13. dubna 2021

.....

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 bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat paní Ing. Heleně Štěřbové za velmi cenné rady a za pomoc s prací v laboratoři. V neposlední řadě děkuji celé své rodině, která mě podporuje po celou dobu studia.

Obsah

1. Úvod	1
1.1. Přírodní toxiny	1
1.2. Včela medonosná (<i>Apis mellifera</i> L.)	1
1.2.1. Základní informace.....	1
1.2.2. Morfologie	1
1.2.3. Fyziologie a anatomie.....	2
1.3. Včelí žihadlo	4
1.3.1. Včelí jed.....	4
1.3.2. Složení včelího jedu	4
1.3.3. Působení včelího jedu na organismus.....	5
1.4. Antistresové obranné reakce hmyzu	5
1.5. Hmyzí antistresové hormony	6
1.6. Vitellogenin	6
1.6.1. Význam vitellogeninu v imunitě hmyzu	7
1.7. Trávení u hmyzu	7
1.7.1. Trávicí enzymy hmyzu a jejich význam.....	7
2. Cíle práce	9
3. Materiály a metodika	10
3.1. Chov včely medonosné <i>A. mellifera</i>	10
3.2. Pitva včelích orgánů	10
3.2.1. Jedový váček.....	10
3.2.2. Mozek (CNS).....	10
3.2.3. Střevo.....	10
3.2.4. Odebírání hemolymfy.....	11
3.3. Aplikace včelího jedu do včelího těla	11
3.4. Stanovení mortality	11
3.5. Stanovení hladiny AKH v CNS pomocí ELISA	11
3.6. Stanovení aktivity enzymů střeva	13
3.6.1. Stanovení proteázové aktivity	13
3.6.2. Stanovení lipázové aktivity	14
3.6.3. Stanovení amylázové aktivity.....	14
3.7. Stanovení živin v hemolymfě	15
3.7.1. Stanovení hladiny glycidů	15
3.7.2. Stanovení hladiny proteinů.....	15
3.7.3. Stanovení hladiny lipidů.....	16
3.8. Stanovení vitellogeninu v hemolymfě pomocí ELISA	16
3.9. Statistické zpracování výsledků	16
4. Výsledky	17
4.1 Vliv včelího jedu na mortalitu	17

4.2.	Vliv včelího jedu na hladinu AKH v CNS.....	17
4.3.	Vliv včelího jedu na aktivitu trávicích enzymů.....	18
4.4	Vliv včelího jedu na hladinu živin v hemolymfě.....	20
4.5.	Vliv včelího jedu na hladinu vitellogeninu v hemolymfě.....	22
5.	<i>Diskuze</i>	24
6.	<i>Závěry</i>	27
7.	<i>Seznam použité literatury</i>	28

1. Úvod

1.1. Přírodní toxiny

Přírodní toxiny jsou chemické látky produkované živými organismy a mohou mít negativní vliv na jiné organismy a zapříčinit tak jejich poškození nebo i smrt. Obecně je jejich význam jednoduchý, slouží totiž jako chemická zbraň, a to jak k vlastní obraně před nepřáteli, tak k útoku zpravidla s cílem získat potravu.

Živočichové mohou jako toxiny využívat odpadní produkty metabolismu nebo je mohou aktivně syntetizovat ve specifických jedových žlázách. V obou případech jsou toxiny produkovány samotnými živočichy – jde tedy o primární jedovatost. Existují ale i živočichové, kteří během života hromadí toxiny získané z potravy, pak se jedná o tzv. sekundární jedovatost.

Přírodních toxinů je v přírodě obrovské množství a některé z nich mohou mít i pozitivní využití pro člověka (Patočka a kol., 2004).

1.2. Včela medonosná (*Apis mellifera* L).

1.2.1. Základní informace

Včela medonosná se řadí mezi blanokřídlý hmyz (Hymenoptera) a patří do čeledi včelovitých (Apidea); v této čeledi je přibližně 12 tisíc druhů. Včela medonosná získala svou dnešní podobu již asi před 15 miliony let. Jedná se o typického eusociálního zástupce, kde se klasické včelstvo skládá z jedné matky, mnoha dělnic (50 až 60 tisíc, pouze v zimním období se jejich počet sníží na 10-20 tisíc jedinců) a několika stovek trubců (300-600), přičemž každý z nich má v úlu přesně definované úlohy.

1.2.2. Morfologie

Včela medonosná je známa svým černo-žlutým zbarvením. Tělo je článkované a je rozděleno na hlavu, hrud' a zadeček, volné spojení mezi články umožňuje včelám pohyb. Tělo dělnice dosahuje délky asi 1,5 cm, v případě trubce a matky to může být až 2,5 cm. Vnější kostru těla tvoří integument, který se skládá z kutikuly, epidermis a bazální membrány. Kutikula je komplikovaná struktura, která se dělí na tři vrstvy, a to na epikutikulu, která je tvořena lipoproteinovým komplexem známým jako kutikulin a různými druhy vosků. Další vrstva se nazývá exokutikula a je v ní obsažen melanin (pigment), který se podílí na celkovém zbarvení. Dále exokutikula obsahuje chitin, bílkoviny, sacharidy, vosky, uhlovodíky, aminokyseliny, fenolické látky, pigmenty a řadu dalších látek. Poslední vrstva je tvořena endokutikulou, která je nejsilnější a nasedá na epidermis (Gruna a kol., 2016). Má podobné chemické složení jako

předchozí vrstva. Všechny tři vrstvy kutikuly dohromady tvoří pevnou, pružnou a vnějším podmínkám odolnou vnější kostru.

Na rozdíl od zbytku těla hlavové články již úplně splynuly. Dělnice a matky mají trojúhelníkový tvar s menším zaoblením, naopak trubci mají tvar hlavy o něco zaoblenější (Rejnič a kol., 1995). Na hlavě se nachází dvě facetové (složené) oči, které slouží k samotnému vidění a tři jednoduché oči, které reagují na světelné rozdíly. Dále se zde nacházejí tykadla, která slouží jako čichový a hmatový (sluchový) orgán. Ústní ústrojí se skládá z kusadel, sosáku, horního a dolního pysku (Veselý, 2003). Kusadla jsou u včel velice ostrá a u dělnic slouží primárně k úpravě pylu a vosku, nebo k jejich vlastní obraně. Na rozdíl od matek a trubců, kteří používají kusadla pouze pro pohyb mezi buňkami. Včela má lízavě sací ústrojí, které tvoří sosák. Hraje významnou roli nejen při sání nektaru, ale slouží i ke krmení plodu (Gruna a kol., 2016).

Hrud' je rozdělena na předohrud' (prothorax), středohrud' (mesothorax) a zadohrud' (metathorax), na každé této části se nachází pár nohou, které slouží jak k pohybu, tak zvláště u dělnic ke sběru pylu nebo k čištění těla (Diemer, 1997). Dále hrud' nese dva páry blanitých křídel, která jsou pokryta drobnými chloupky, pouhým okem neviditelnými. Poslední částí těla včely medonosné je zadeček, je složen z 9 článků a je v něm uložena většina včelích orgánů, například trávicí soustava včetně medného váčku, Malpighické trubice nebo pohlavní ústrojí (Veselý a kol., 2003).

Na posledním článku zadečku se nachází vonná žláza, hlavní složkou vonného sekretu z této žlázy je kyselina geraniová, geraniol a další chemické látky. Je to typický feromon, který slouží jako dorozumívací prostředek. Pomáhá včelám při orientaci roje nebo například slouží k označení zdroje potravy (Veselý a kol., 1999). Mezi velmi důležité žlázy můžeme zařadit také voskovou žlázu, která se nachází na břišní straně těla. Výsledným produktem těchto žláz je vosk, který je tvořen pomocí voskových zrcadélek. Vosk je vylučován v tekutém stavu, ale po kontaktu se vzduchem ztuhne do tzv. šupinky a ta zůstane zachycena na břišní destičce (sternitu), dokud si ji včela pomocí nohou nepřenese ke kusadlům a pomocí kusadel zpracuje. Takto zpracovaný vosk, který je smíchán i s dalšími sekrety, je teprve použit pro stavbu včelích plástů (Gruna a kol., 2016).

1.2.3. Fyziologie a anatomie

Anatomie orgánových soustav a samotných orgánů včely medonosné celkově odpovídá tělnímu plánu hmyzu, přesto můžeme u včely najít několik zajímavých přízpůsobení.

Trávicí soustava u včely medonosné je složena z trávicí trubice, která je rozdělena na přední část (*stomodeum*), střední část (*mezenteron*) a zadní část (*proctodeum*). Trávicí ústrojí začíná

ústý, na která navazuje hltan, který je rozdělen na epipharynx a ten posléze přejde do trubice, která je obalena svaly a pomocí těchto svalů dochází ke vzniku podtlaku v sósáku a nasátí potravy. Po stranách hltanu můžeme najít vyústění hltanových žláz. V nich dochází k tvorbě mateří kašičky, kterou krmí včely nejen své larvy, ale také matku (Veselý a kol., 2003). Další částí trávicí trubice je jícen, který posouvá potravu do dalších částí soustavy. Jícen se v zadečkové části rozšíří v medný váček, jinak ho můžeme nazývat jako „sociální“ žaludek. V tomto žaludku se shromažďuje nektar, který včela zpětně vyvrhne a zpracovává do známé podoby, kterou je med. Jak je již výše zmíněno, každá včela má v úlu jasně daný úkol, a i produkce medu je výsledkem jejich kolektivní práce (Veselý a kol., 2003; Gruna a kol., 2016). Množství potravy, která prochází přes medný váček do žaludku, je kontrolováno česlem. Česlo zasahuje jak do medného váčku (hlava česla), tak do žaludku (trubičkovitý konec česla). Česlo třídí potravu na tu, která se zpětně vyvrhne (produkce medu) a tu, která postupuje dále do žaludku a středního střeva, kde slouží jako vlastní potrava. K ochraně povrchu středního střeva slouží peritrofická membrána. Ta je důležitá především jako ochrana před poraněním sliznice střeva ostrými částicemi, které se mohou nacházet v potravě (Gruna a kol., 2016). Peritrofická membrána zajišťuje také kompartmentalizaci trávicího prostoru. Další částí trávicí trubice je proctodeum, kde dochází ke zpracování hůře stravitelných zbytků potravy a k posunu obsahu střeva do výkalového váčku. Výkalový váček je konečná část trávicí soustavy, kde dochází ke skladování výkalů, a to hlavně v zimních měsících, protože včela vylučuje výkaly pouze mimo úl, což v zimě není možné (Diemer, 1997). Do trávicí soustavy nepřímo patří také tukové těleso, ale jeho funkce je především zásobní, a to hlavně u zimních včel, kde není zajištěn pravidelný přísun potravy (Gruna a kol., 2016).

Nervová soustava je u včel, podobně jako u ostatních skupin hmyzu, gangliová a je vytvářena mozkem, břišní nervovou páskou a periferní nervovou soustavou. Včelí mozek je velice dobře vyvinutý, zvláště oblasti, které kontrolují sociální chování. Významnou asociační strukturou jsou hlavně houbovitá tělesa protocerebra. Ta jsou u sociálního hmyzu vyvinuta mnohem více než u ostatních jednodušších skupin hmyzu. Je zajímavé, že houbovitá tělesa se mohou během života jedince zvětšovat s nabíráním zkušeností. Mozek se nepodílí pouze na hlavních řídicích funkcích, ale zajišťuje také instinktivní chování a podílí se i na reflexní činnosti (Chapman, 1998).

1.3. Včelí žihadlo

Žihadlo se nachází pouze u matek a dělnic, u trubců chybí. U matek slouží žihadlo k příležitostným soubojům mezi matkami a má také roli při orientaci kladeného vajíčka. U dělnic slouží k obraně samotné včely nebo celého úlu, případně k útoku na jinou včelu nebo cizí úl. Když včelám nehrozí žádné nebezpečí, je žihadlo zataženo v žihadlové pochvě. Samotné bodnutí probíhá tak, že dojde ke stažení zadečku dolů, žihadlo je vytlačeno a jeho bodlo, tvořené dvěma žihadlovými štětinkami, se zapíchne do napadeného organismu. Na vnějších stranách štětin se nachází vratizoubky, které se v oběti zachytí a při vzájemném klouzavém pohybu štětin pronikají hlouběji do tkáně. Vratizoubky zabraňují vytažení žihadla, a pokud se včela o to pokusí, dojde k odtržení koncové části zadečku s žihadlovým aparátem. Včela při tom zpravidla zahyne. Odtržený zadeček však obsahuje ganglium, které zajišťuje pumpování jedu do rány ještě několik minut poté (Gruna a kol., 2016). K odtržení žihadlového aparátu dochází pouze při bodnutí do savce anebo ptáka; pokud včela bodne hmyz, tak lze žihadlo z rány vytáhnout. Důvodem je elastická stavba hmyzího integumentu (Bogdanov, 2016). Nedávno bylo zjištěno, že špička žihadla má zoubkovaný okraj, který pravděpodobně zvyšuje účinnost včelího bodnutí (Weyda a Kodrík, 2020).

1.3.1. Včelí jed

Je to bezbarvá tekutá látka, která má hořkokyselou chuť a charakteristické aroma. Když dojde k jejímu vysušení, tak vykrytalizuje v bělošedou látku. Je produkován jedovou žlázou, která je schopna funkce ihned po vylíhnutí dospělé včely, a je skladován v jedovém váčku, který se nachází v zadečkové části těla (viz 1.2.2). V jedovém váčku bývá přibližně 0,1-0,3 mg samotného jedu, množství jedu závisí na stáří samotné včelí dělnice, anebo na množství bílkoviny v potravě – pokud nedochází k dostatečnému vytváření jedu, může to být známka malého množství bílkoviny v přijímané potravě (Titěra, 2006). Mezi další vlivy můžeme zařadit klimatické podmínky nebo roční období. Samotná včela používá svůj jed jako obranu proti nepřátelům, ale pro lidskou populaci může mít jed i léčebné účinky (Titěra, 2006).

1.3.2. Složení včelího jedu

Včelí jed je podobně jako ostatní hmyzí jedy složen z řady biologicky aktivních látek, které jsou rozpuštěné ve vodném roztoku, přičemž sušina je zastoupena asi 30 %. Nejdůležitější složkou jedu je melitin, který tvoří 50 % celkové hmotnosti sušiny. Melitin je nízkomolekulární bílkovina, která aktivuje fosfolipázy a má také vlastní fosfolipázovou aktivitu. Fosfolipázy štěpí fosfolipidy buněčných membrán, což vede k jejich poškození (proděravění) a následné destrukci buněk (Bogdanov, 2016; Veselý a kol., 2003). Melitin

napadá hlavně erytrocyty a leukocyty. Apamin, který je zastoupen pouze 3 % v celkové hmotnosti jedu, má silný vliv na nervovou soustavu. V neposlední řadě včelí jed obsahuje MCD peptid nebo minimim. Další látky, jako například histamin, dopamin nebo noradrenalin, jsou obsaženy pouze v malém množství. Nicméně histamin se řadí mezi hlavní stimulatory zánětu a je obsažen nejen v samotném jedu, ale uvolňuje se i z poškozených buněk napadeného jedince (Bogdanov, 2016; Moreno a Giralt, 2015). Včelí jed obsahuje také vitellogenin, který zřejmě zvyšuje jeho alergické vlastnosti (Salmela a kol., 2015), viz také níže.

1.3.3. Působení včelího jedu na organismus

Působení jednotlivých toxinů včelího jedu v těle oběti na sebe navazuje a účinnost toxinů se navzájem stimuluje, což vede k vyšší účinnosti jedu, než kdyby jednotlivé reakce probíhaly samostatně. Celkově jed vyvolá zčervenání v místě vpichu, svědění nebo pálení, bolest a otok, může ale vyvolat i alergickou reakci (Sandberg, 1978; Veselý a kol., 2003). Primárním účinkem jedu je narušení buněčných membrán působením melitinu a fosfolipáz, což vede k vylití obsahu buněk a jejich zániku. Na to navazuje enzym hyaluronidáza, která dokáže štěpit spoje mezi buňkami, a tak se jed může tkáněmi rychleji šířit a snadněji dostávat hlouběji až k cévám. Důležitou roli mají biogenní aminy, třeba dopamin a noradrenalin, které stimulují srdeční činnost a transport jedu po celém organismu. Citlivost tkání k jedu je zvýšena serotoninem, histamin zase zvyšuje pronikání jedu do tkání zvýšením propustnosti kapilár a stimulováním zánětu a dalších imunitních reakcí (Bogdanov, 2016). Je zřejmé, že působení včelího jedu se vyvinulo v sofistikovaný sled fyziologických a biochemických reakcí, což nepochybně přispělo k evoluční úspěšnosti včel.

1.4. Antistresové obranné reakce hmyzu

Stres je každodenní součástí života všech organismů, které si během evoluce vytvořili proti stresu obranné reakce. Ty umožňují dopad stresu na organismus eliminovat nebo alespoň zmírnit jeho účinky. Mezi běžné stresory živočichů patří vnější a vnitřní fyzikální, chemické a biologické vlivy, jako např. působení různých parazitů a predátorů, mezi chemické řadíme působení různých toxinů a insekticidů. Tyto stresory vedou k vyvolání obranné anti-stresové reakce organismu, jejímž cílem je obnovit homeostázu organismu. Na řízení těchto reakcí se podílí nervová a endokrinní soustava, které se navzájem se doplňují (Hightower, 1991). Nervová soustava reaguje na stres okamžitě, naopak endokrinní soustava reaguje dlouhodobě pomocí hormonů.

1.5. Hmyzí antistresové hormony

Mezi nejznámější hmyzí stresové hormony patří adipokinetické hormony (AKH), které řadíme do skupiny peptidických neurohormonů. Mezi členovci jde o jednu z nejvíce probádaných skupin. V současnosti je popsáno okolo 60 druhů těchto hormonů.

Adipokinetické hormony (AKH) jsou peptidy o délce 8–10 aminokyselin, na jejichž C konci se nachází amidová skupina a na N konci kyselina pyroglutamová. K jejich syntéze dochází v endokrinní žláze corpora cardiaca (Gäde a kol., 1997). Z této žlázy dochází k uvolnění hormonu do hemolymfy a ta zajistí přenos do cílových buněk, povětšinou v tukovém tělese. Hlavní funkcí těchto hormonů je mobilizace energetických zásob při stresové situaci, AKH jsou však pleiotropní a zajišťují řadu dalších reakcí – mohou zvyšovat tlak v hemolymfě, podporovat činnost srdce, dále stimulují pohybovou soustavu nebo pomáhají v aktivaci imunitního systému a mnohé další (Kodrík, 2008).

Jak je již výše zmíněno, AKH řadíme do dobře probádaných hormonálních skupin u hmyzu. Objasnění primární struktury AKH u včely však provázelo několik let zmatků a protichůdných informací, nicméně se skupině Marchal a kol. (2018) podařilo strukturu včelího AKH objasnit: – pGlu-Leu-Thr-Phe-Thr-Ser-Ser-Trp-Gly-NH₂. Hormon dostal kódové označení Schgr-AKH-II, protože jeho struktura už byla dříve popsána u saranče pustinné *Schistocerca gregaria*. Funkce AKH u včely medonosné však není zcela jasná. U některých plemen včel AKH zvyšuje hladinu cukru v hemolymfě (Chapman, 1998), u jiných plemen však nebyla tato funkce AKH prokázána (Chapman, 1998). Neví se ani, zda se množství AKH liší mezi jednotlivými kastami včel.

1.6. Vitellogenin

Vitellogeniny řadíme do skupiny samičích glykolipoproteinů, k jejich syntéze dochází v tukovém tělese, konkrétně v trofocytech a ty během vitellogeneze produkují vysoké množství proteinů. Vitellogeniny hrají důležitou roli ve vitellogenezi, což je proces, při kterém dochází pomocí hemolymfy k přenosu potřebných živin a energie ve formě žloutku do pohlavních buněk (oocytů). Malé množství vitellogeninů však můžeme najít i u samců některých druhů hmyzu (Kodrík a kol., 2019).

Vitellogeneze je velmi složitý proces, který je řízen nervovou soustavou i hormonálně. Podílí se na něm řada hmyzích hormonů – juvenilní hormony, ekdysteroidy a dokonce i neurohormony. U většiny skupin hmyzu hrají hlavní úlohu v syntéze vitellogeninů juvenilní hormony, ale např. u *Diptera* to jsou ekdysteroidy. Naopak k potlačování produkce vitellogeninu slouží adipokinetické hormony – AKH (Chapman, 1998).

Vitellogeniny však mají celou řadu funkcí, mezi ně patří rozdělení do kast u sociálního hmyzu, ochrana před oxidačním stresem a hrají také roli v imunitě hmyzu, viz. následující kapitola (Singh a kol., 2013; Salmela a kol., 2015). Konkrétně u včel je hladina vitellogeninu rozdílná v rámci kast, nejvyšší množství vitellogeninu je u včelích královen, které mají za úkol kladení vajíček. Nejméně vitellogeninu je produkováno u trubců jako důsledek nižšího množství pohlavního hormonu (Engels a kol., 1990).

1.6.1. Význam vitellogeninu v imunitě hmyzu

Jak již bylo zmíněno, vitellogenin nehraje roli pouze v tvorbě vaječného žloutku, ale stimuluje také hmyzí imunitu. Například studie Singh a kol. (2013) provedená na včele medonosné a bourci morušovém ukazuje, že vitellogenin má silnou antibakteriální odpověď proti grampozitivním a gramnegativním bakteriím. Nedávno bylo také prokázáno, že působí i proti entomopatogenním hlísticím a houbám (Kodrík a kol., 2019). Z praktického hlediska je zajímavé, že vitellogenin je aktivní proti grampozitivní bakterii *Paenibacillus larvae*, (Salmela a kol., 2015), která napadá larvy včely a způsobuje jedno z nejzávažnějších onemocnění u včel – mor včelího plodu. Vitellogenin také slouží k přenosu imunity mezi generacemi, a to mezi včelí matkou a včelími plody (Singh a kol., 2013).

1.7. Trávení u hmyzu

Trávicí soustava slouží k zachycování potravy a jejímu následnému mechanickému a chemickému zpracování pomocí orgánů trávicí soustavy. Po zpracování dochází k transportu potřebných živin oběhovou soustavou. Trávení můžeme dělit na dvě skupiny podle místa zpracování. Pokud dochází k trávení živin přímo v dutinách trávicí soustavy, mluvíme o extracelulárním trávení. Pokud dojde k fagocytóze malých částí potravy buňkami epitelu a k trávení v jejich cytoplazmě, mluvíme o intracelulárním trávení. Zbytky potravy, která se nestráví, jsou vyloučeny z těla ven (Chapman, 1998).

1.7.1. Trávicí enzymy hmyzu a jejich význam

Enzymy jsou chemické látky sloužící jako katalyzátory, jejichž hlavním úkolem je zrychlit chemické reakce za účelem homeostázy mezi výchozími látkami a produkty. Toho je dosaženo redukcí aktivační energie, která je nezbytná pro uskutečnění reakce a zároveň nedochází ke změně struktury základní směsi.

Zastoupení enzymů ve střevě hmyzu závisí na přijímané potravě, což je v případě hmyzu velmi různorodé. Například u švába amerického (*Periplaneta americana*) hrají hlavní roli amylázy (Bodláková a kol., 2017).

Tak jako u jiných skupin živočichů jsou základními trávicími enzymy hmyzu, a tedy i včel, lipázy, amylázy a proteázy. Lipázy jsou enzymy, které řadíme do skupiny hydroláz. Jejich hlavním úkolem je štěpení jednoduchých acylglycerolů (na mastné kyseliny a glycerol), případně dalších složitějších lipidů. Konkrétně u hmyzu dochází ke štěpení triacylglycerolu na diacylglycerol, který slouží jako hlavní transportní forma tuků v hemolymfě (Karlson, 1981). Amylázy řadíme do skupiny glykosidáz, rozdělují se na α , β , γ amylázy. V jejich přítomnosti dochází k rozkladu o – glykosidické vazby mezi oligosacharidy a polysacharidy, čímž vznikají jednodušší sacharidy (Karlson, 1981). U hmyzu a většiny živočichů se nachází pouze alfa amylázy zodpovědné za štěpení 1,4- glykosidické vazby polysacharidů, majících tři a více glukózových jednotek. Proteázy řadíme do jedné z početných skupin hydroláz. Mezi hlavní funkce těchto enzymů patří štěpení peptidických vazeb proteinů. Tyto peptidázy můžeme rozdělit na endoproteázy a exoproteázy. Aktivita střevních enzymů je u hmyzu ovlivněna řadou faktorů včetně hormonů, významnou úlohu hrají i AKH (Bodláková a kol., 2017, 2018).

2. Cíle práce

Cílem této práce bylo sledování fyziologických reakcí u včely medonosné po aplikaci včelího jedu. To zahrnovalo:

1. Pozorování změn v aktivitě trávicích enzymů (lipázy, amylázy a proteázy) ve střevě a hladině adipokinetického hormonu (AKH) v CNS.
2. Sledování hladiny živin (glycidy, lipidy a proteiny) v hemolymfě.
3. Zmapování změny množství vitellogeninu v hemolymfě.

3. Materiály a metodika

3.1. Chov včely medonosné *A. mellifera*

Pokusné včely byly získávány ze včelnice Biologického centra AVČR v Českých Budějovicích. Na všechny pokusy byly použity dělnice neurčeného stáří.

3.2. Pitva včelích orgánů

Před pitvou byly včely narkotizovány tak, že byly umístěny na led po dobu 15 minut, aby došlo ke snížení pohybové aktivity. Samotná pitva probíhala pod binokulárním mikroskopem na voskové destičce s pomocí pitevních pinzet, špendlíků a malých nůžek.

3.2.1. Jedový váček

Tělo včely bylo pomocí špendlíků přichyceno k voskové destičce, ve které byl nalit Ringerův fyziologický roztok z důvodu zabránění vysychání orgánů při pitvě. Potom byl ze zadečkové části těla vytržen žihadlový aparát a z něj pomocí pinzety odebrán samotný jedový váček. Vypitvané jedové váčky (100 kusů) byly umístěny do mikrozkušavek Eppendorf (objem 1.5ml) a následně zcentrifugovány (3 minuty, 10 000 otáček), přičemž došlo k popraskání váčků a uvolnění surového jedu. Jed byl přepipetován do nové mikrozkušavky a uložen do mrazničky (-18 °C) k dalšímu použití.



Obr.1. Vypitvaný jedový váček. (vlastní fotografie).

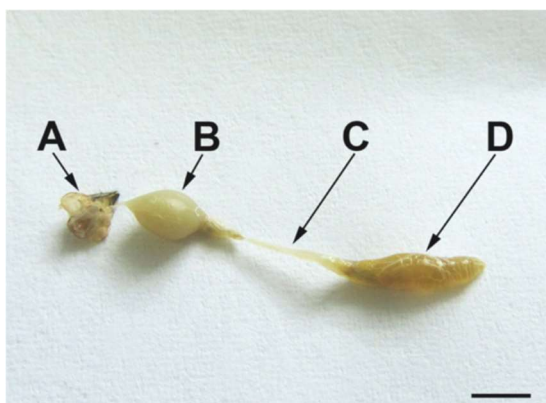
3.2.2. Mozek (CNS)

V prvním kroku došlo k odstřihnutí hlavové části včely pomocí nůžek. Poté byla hlavová část byla upevněna k voskové destičce s Ringerovým roztokem a mozek byl spolu s endokrinním orgánem corpora cardiaca pomocí pinzet vypreparován a vložen do mikrozkušavek (Eppendorf). Vzorky byly uloženy do mrazničky (-18°C) k dalšímu použití.

3.2.3. Střevo

Pitva probíhala na voskové destičce, kde bylo tělo včely medonosné přichyceno dorzální stranou nahoru pomocí špendlíků. Pevná kutikula byla rozstřižena pomocí nůžek a z těla bylo

odebráno celé střevo (Obr. 2) pomocí 2 pinzet. Vypitvané střevo bylo zváženo a umístěno do mrazničky (-18°C) k dalšímu použití.



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

3.2.4. Odebírání hemolymfy

U znehybněné včely byla jehlou narušena kutikula. Poté byla přiložena mikro-kapilára, do které se hemolymfa nasála. Odebraný vzorek byl přemístěn do mikrozkušavky o objemu 1,5 ml. Zkušavku bylo nutno držet na ledu, aby nedošlo k melanizaci hemolymfy; poté byl vzorek umístěn do mrazničky (-18°C) k dalšímu použití.

3.3. Aplikace včelího jedu do včelího těla

Včelí jed vpichovaný do včely medonosné in vivo byl ředěn v Ringerově fyziologickém roztoku tak, aby ekvivalent - 0,35; 0,7 a 1,4 μl jedu – byl obsažen v 2 μl roztoku. Kontrolní skupina byla injikována 1,4 μl Ringerova fyziologického roztoku. Poté byly včely drženy ve speciálních klíčkách při teplotě 38°C a po 24 hodinách z nich byly vypitvány orgány na jednotlivá stanovení, jak je uvedeno výše.

3.4. Stanovení mortality

Mortalita včel po aplikaci vlastního jedu byla stanovována kvůli zjištění účinnosti a vytipování jeho vhodné dávky 24 hodin po ošetření. Pro tento pokus bylo použito 5 skupin včel s přibližně 20 jedinci v každé skupině, tedy celkem asi 100 včel. Výsledná hodnota byla vyjádřena jako procento mortality.

3.5. Stanovení hladiny AKH v CNS pomocí ELISA

Reagencie:

- Aplikací pufr (CB) - smíchání 1,272g Na_2CO_3 a 1,512g NaHCO_3 do 300ml destilované H_2O .

- Mléko – Skim milk Powder (Sigma – Aldrich) – blocking buffer (1g mléka do 20ml WB⁺)
- Promývací pufr (WB⁺) - pH 7,5, 10mM PBS (zásobní roztok, který je složen z NaH₂PO₄ × 12 H₂O, KH₂PO₄, který je ředěn 1:9 na pracovní roztok) + 0,1 ml Tween/100 ml WB
- Primární protilátka – Rabbit – anti Schgr – AKH-II – antisérum (komerčně připravená firmou Pineda, Berlin, Německo)
- Sekundární protilátka – Swine anti rabbit IgG/ HRP
- Substrát Sigma T444, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidene (SIGMA, SLCG1025)
- 0,5 M kyselina sírová (PENTA, 20450-12500)
- Standard – Schgr – AKH II (10pml)

K vypitvané CNS (v každé mikrozkuhavce byl vždy 1 vypitvaný mozek spolu s endokrinním orgánem corpora cardiaca) bylo přidáno 200μl 80 % metanolu, CNS byla rozsonikována pomocí jehlového sonikátoru a následně byla stočena v centrifuze po dobu 5 minut (4°C). Poté byl supernatant přepipetován do nové mikrozkuhavky a celý proces zopakován; oba supernatanty byly spojeny a odpařeny ve vakuové centrifuze (Concentrator 5301). Vzorky byly rozpuštěny v CB, tak aby ekvivalent jedné CNS byl obsažen ve 100 μl roztoku. Toto množství pak bylo nanášeno do jamek 96jamkové destičky. Ke každé sadě byl aplikován také blank (100μl CB). Současně se vzorky byl na destičku nanášen také standard hormonu Schgr-AKH-II, ředěný dvojkovou řadou od počáteční dávky 10 pmol. Nakonec se destička zalepila folií, aby nedošlo ke kontaminaci vzorků nebo odparu roztoků a následně byla umístěna na 24 hodin do ledničky. Druhý den byla destička 3x promyta pomocí WB⁺(200μl). Pak byl do jamek napipetován blokovací roztok Skim milk Powder a destička inkubována 120 minut při 37°C. Po uplynutí této doby byla destička znovu 3x promyta (WB⁺). V dalším kroku byla do každé jamky přidána primární protilátka – Rabbit – anti Schgr-AKH-II – v množství 100μl na jamku (ředění 1:20 000). Následovala inkubace při 37°C po dobu 60 minut. Po této době došlo znovu k promytí destičky 200μl WB⁺. Po promytí byla do každé jamky napipetována sekundární protilátka – Swine anti rabbit IgG/ HRP v množství 100μl na jamku (ředění 1:2 000). Následovala další inkubace po dobu 60 minut při 37°C a poté došlo k promytí destičky (6x).

Posléze bylo do všech jamek přidáno 100μl substrátu Sigma T444, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine a destička byla zabalena do alobalu a inkubována po dobu 40 minut (37°C). V posledním kroku bylo přidáno 50μl 0,5 M kyseliny sírové, což vedlo k zastavení reakce. Hodnoty absorbance byly měřeny na ELISA čtečce při vlnové délce 450nm.



Obr. 3. ELISA reader, Spectra Max 340 PC, Molecular Devices, USA. (vlastní fotografie).

3.6. Stanovení aktivity enzymů střeva

Vypitvaná střeva byla sonikována pomocí jehlového sonikátoru (15-20 sekund) v 0.2M tris/HCl, pH 7,8 (200 μ l/střevo). Poté byly vzorky zcentrifugovány (5 minut, 10 000 otáček) a supernatanty přepipetovány do nových mikrozkušavek, které byly uchovávány v mrazničce. Následně byla ve vzorcích stanovena proteázová, lipázová a amylázová aktivita.

3.6.1. Stanovení proteázové aktivity

Proteázová aktivita byla stanovena pomocí resorufin – kaseinového kitu podle příloženého návodu firmy Roche.

Reagencie:

- Substrátový roztok (0,4 % resorufin – kasein rozpuštěný ve vodě)
- 0,2 M Tris HCl, pH 7,8
- 0,02 M CaCl₂
- 5% Kyselina trichloroctová (TCA)

Postup:

Po připravení stanovených reaglií byla samotná proteázová reakce provedena v eppendorfkách, kde došlo ke smíchání 40 μ l 0,2 M trisu, 20 μ l 0,02 M CaCl₂, 20 μ l resorufin – kaseinu a 20 μ l extraktu střeva (tedy ekvivalent 0,1 střeva). Blank obsahoval 60 μ l 0,2 M trisu, 20 μ l 0,02 M CaCl₂ a 20 μ l resorufin – kaseinu. Poté byly všechny vzorky 60 minut inkubovány při 37°C. Ihned po inkubaci byla reakce zastavena pomocí 240 μ l 5% kyseliny trichloroctové

a vzorky byly inkubovány dalších 10 minut. Následovala centrifugace (3 minuty při 10 000 otáčkách) a z každé mikrozkušavky bylo přepipetováno do mikrodestičky (96 jamek) 300 μ l supernatantu. Absorbance byla měřena na ELISA čtečce (Obr. 3) při vlnové délce 490nm. Výsledky byly vyjádřeny v relativní absorbanci na miligram hmotnosti střeva.

3.6.2. Stanovení lipázové aktivity

Aktivita lipáz ve střevě byla stanovena podle práce Robertse (1985).

Reagencie:

- 50mM 4MU – butyrate (M=246,26) - 0,0123g této reagencie bylo rozpuštěno v objemu 1ml DMSO (dimetylsulfoxid). Na reakci se roztok ředí 25x.
- 0,2M Tris HCl, pH 7,8

Postup:

Lipázová aktivita byla měřena v tmavých 96- jamkových destičkách. Do každé jamky bylo napipetováno 5 μ l extraktu střeva (tedy ekvivalent 0,025 střeva) a 190 μ l 0,2M trisu. Dále bylo přidáno 5 μ l 50mM 4MU – butyrate (rozpuštěného v DMSO, nutno pipetovat v přítmí). Ke každé sadě byl namíchán také blank, který byl složen z 195 μ l 0,2M Trisu a z 5 μ l 50mM 4MU – butyrate. Výsledná kinetická fluorescence byla měřena na fluorimetru značky Biotek při 327nm/449nm exc/em. Takto měřené výsledky byly přepočítány na nmol 4 MU/miligram střeva (použité hodnoty byly z časů 0 a 30 min měření).

3.6.3. Stanovení amylázové aktivity

Amylázová aktivita byla stanovena metodou podle Bernfelda (1955).

Reagencie:

- Fosfátový pufr + 20 mM NaCl
- Kyselina 3,5- dinitrosalicylová (DNS)
- Substrátový roztok - 2% škrob

Postup:

Amylázová aktivita byla stanovována v mikrozkušavkách (1,5 ml), kde došlo ke smíchání 25 μ l extraktu střeva (tedy ekvivalent 0,125 střeva), 25 μ l fosfátového pufru + 20mM NaCl a 25 μ l substrátového roztoku 2 % škrobu. Vzorky byly promíchány a inkubovány 1 hodinu při 37°C. Po inkubaci bylo do každého vzorku přidáno 200 μ l DNS, což vedlo k zastavení reakce. Po tomto kroku byly vzorky zahřáty na 100°C po dobu 5 minut v blokovém termostatu, po následném ochlazení byly zcentrifugovány (10 minut, 10 000 otáček). V posledním kroku bylo z mikrozkušavek přepipetováno 200 μ l supernatantu do jamek 96- jamkové destičky. Absorbance byla měřena na ELISA čtečce při 550nm (Obr. 3). Pro zpracování grafu byly

výsledky přepočteny na množství maltózy/miligram hmotnosti střeva (Bodláková a kol., 2017).

3.7. Stanovení živin v hemolymfě

3.7.1. Stanovení hladiny glycidů

Hladina cukrů v hemolymfě byla stanovena metodou podle Carol a kol. (1954), modifikované v práci Socha a kol. (2004).

Reagencie:

- Destilovaná voda (H_2O)
- Kyselina sírová – 72 % H_2SO_4
- Anthronová reagencie – 150mg anthronu do 100ml 72 % H_2SO_4 .

Postup:

Do 160 μ l destilované vody byl přidán 1 μ l odebrané hemolymfy a 230 μ l anthronové reagencie. Blank obsahoval 160 μ l destilované vody a 230 μ l anthronové reagencie. Poté byly vzorky zahřívány při 100 $^{\circ}C$ po dobu 8 minut a následně bylo z každého vzorku přepipetováno 200 μ l do 96jamkové destičky. Výsledná absorbance byla měřena na ELISA čtečce při vlnové délce 620nm (Obr. 3).

Naměřené hodnoty byly přepočteny podle kalibrační křivky glukózy – ta obsahovala dávky glukózy v rozmezí 0,45- 14,4 μ g.

3.7.2. Stanovení hladiny proteinů

Stanovení hladiny bílkovin v hemolymfě bylo prováděno metodou podle práce Stoscheck (1990) s použitím komerčního kitu BCA protein Assay (Pierce Chemical company).

Reagencie:

- 0,2 M tris – HCl, pH- 7,8
- Reagencie A – sodium bicinchonate (BCA)- 1 g, 2 g Na_2CO_3 , 0,16g sodium tartrate, $NaHCO_3$ - 0,95g a doplníme destilovanou vodou do 100ml
- Reagencie B – $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ - 0,4g a doplníme destilovanou vodou do 10ml.
- BSA – protein standard (bovinní sérum albumin) - Sigma – Aldrich

Postup:

Pracovní roztok byl připraven smícháním 50 dílů reagencie A s 1 dílem reagencie B. Reakční směs byla připravena smícháním 1 μ l hemolymfy, 49 μ l 0,2M tris HCl a 1ml pracovní reagencie. Ke každému vzorku byl vytvořen blank a ten se skládal z 50 μ l destilované vody a z 1 ml reakční směsi. Takto připravené vzorky byly zahřívány na 60 $^{\circ}C$ po dobu 30 minut v termo bločku. V posledním kroku bylo odebráno 200 μ l ze vzorků a toto množství

přepipetováno do 96- jamkové destičky. Výsledná absorbance byla měřena na ELISA čtečce (Obr. 3) při vlnové délce 562nm. Naměřené výsledky byly přepočítány podle kalibrační křivky známého množství BSA (bovinní sérum albumin): 5 - 50 μ g BSA.

3.7.3. Stanovení hladiny lipidů

Stanovení hladiny lipidů v hemolymfě bylo provedeno podle práce Zöllner a Kirsch (1962), modifikované podle práce Kodrík a kol. (2000).

Reagencie:

- 96 % H₂SO₄
- Vanilínová reagens (4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyd) - Sigma Aldrich
 - Vanilínové reagens se připraví rozpuštěním 1,98 g vanilínu v 668 ml kyseliny fosforečné (H₃PO₄) a zahřátím na 60 °C, následně se roztok ochladí a doplní destilovanou vodou do 1 l. Vznikne žlutý roztok, který se musí nechat stát minimálně týden v chladu a temnu.

Postup:

Ve skleněných zkumavkách se smíchal 1 μ l hemolymfy se 100 μ l 96 % H₂SO₄ (blank představoval 100 μ l 96 % H₂SO₄) a vzorky byly vařeny 10 minut ve vodní lázni při 100°C. Po zchlazení byl přidán do všech vzorků 1 ml vanilínové reagens. Po 30 minutách bylo z každého vzorku přepipetováno 200 μ l směsi do 96- jamkové destičky a absorbance byla měřena na ELISA čtečce (Obr. 3) při vlnové délce 546nm. Výsledné hodnoty byly přepočteny podle kalibrační křivky kyseliny olejové (cis-oktadec-9-enová kyselina): 1,412-56,5 μ m kyseliny olejové.

3.8. Stanovení vitellogeninu v hemolymfě pomocí ELISA

Použitý postup byl stejný jako v kapitole 3.5., pouze se lišily některé reagencie.

Ekvivalent 0,01 μ l hemolymfy ve 100 μ l CB byl společně s blankem (pouze 100 μ l CB) napipetován do 96- jamkové destičky, ta byla překryta ochrannou fólií, aby nedošlo ke kontaminaci vzorků a jejich odpařování. Dále bylo použito primární antisérum proti včelímu Vg, které bylo připraveno u nás v laboratoři (ředění 1: 20 000). Jako sekundární antisérum bylo použito Swine anti rabbit IgG/ HRP (ředění 1:2000).

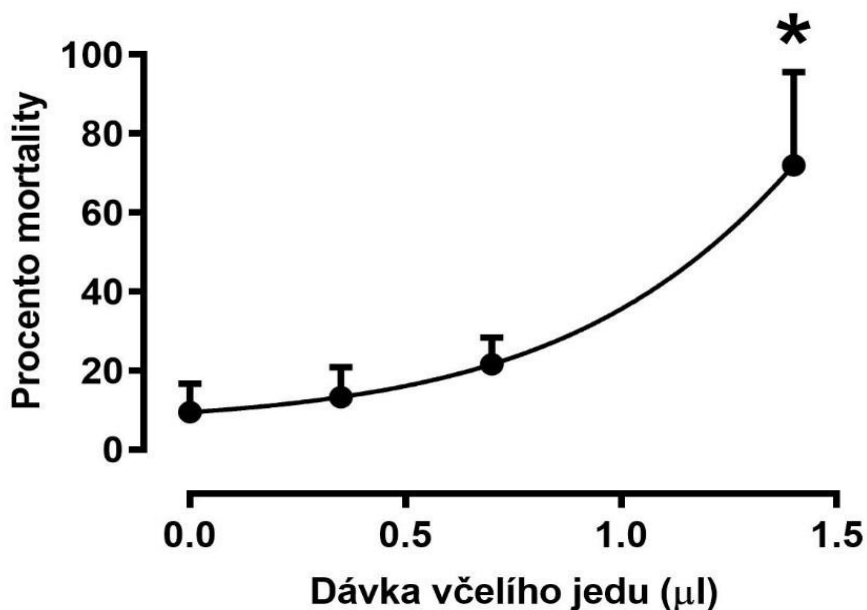
3.9. Statistické zpracování výsledků

Výsledky a grafy byly zpracovány v programu GraphPad Software verze Prism 8 (San Diego, California). Jednocestná ANOVA s Dunnettovým post-testem byly použity pro statistické vyhodnocení výsledků.

4. Výsledky

4.1 Vliv včelího jedu na mortalitu

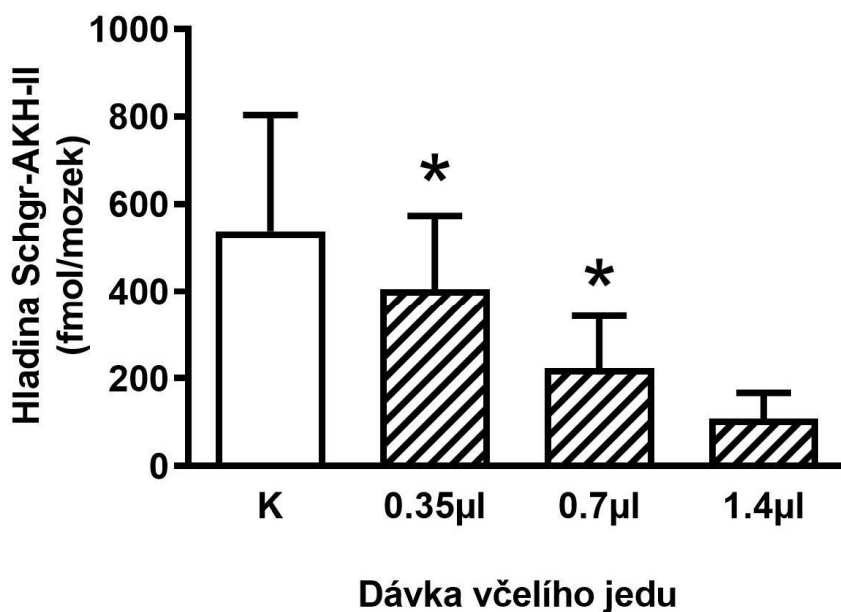
Po aplikaci včelího jedu byla nejprve sledována mortalita u jednotlivých pokusných skupin včel. Na Obr. 4 můžeme vidět, že s navyšující se dávkou stoupala i mortalita u jednotlivých skupin. Nejvyšší dávka jedu zvýšila mortalitu 7,6krát oproti kontrole. Zbylé dávky neměly na mortalitu statisticky průkazný vliv.



Obr. 4. Vliv injekce 0,35 μl , 0,7 μl a 1,4 μl včelího jedu na mortalitu včely medonosné za 24 hodin. Statisticky významné rozdíly na 5 % hladině významnosti, testované pomocí testu jednocestná ANOVA s Dunnettovým post-testem, jsou označeny hvězdičkami; n=6.

4.2 Vliv včelího jedu na hladinu AKH v CNS

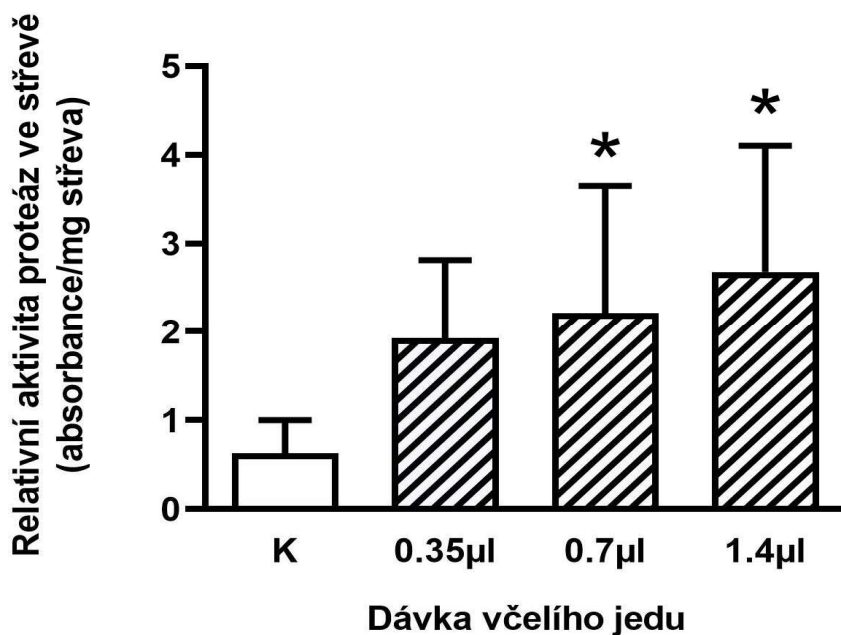
Je zcela jisté, že aplikace včelího jedu vyvolala v těle včely velice silný stres, a právě z tohoto důvodu byla sledována hladina AKH, jakožto antistresového hormonu v centrální nervové soustavě. Na Obr. 5 je zcela jasně vidět, že nejvyšší dávka včelího jedu (1,42 μl) statisticky významně snížila množství AKH v CNS vůči kontrole (asi 5násobně). U dávky 0,7 μl jedu se hladina AKH snížila oproti kontrole 2,4krát. Nejnižší dávka také snížila tuto hladinu, nicméně neměla statisticky průkazný vliv.



Obr. 5. Vliv injekce 0,35µl, 0,7µl a 1,4µl včelího jedu na hladinu AKH v centrální nervové soustavě včely medonosné. Statisticky významné rozdíly na 5 % hladině významnosti, testované pomocí testu jednocestná ANOVA s Dunnettovým post-testem, jsou označeny hvězdičkami; n=8.

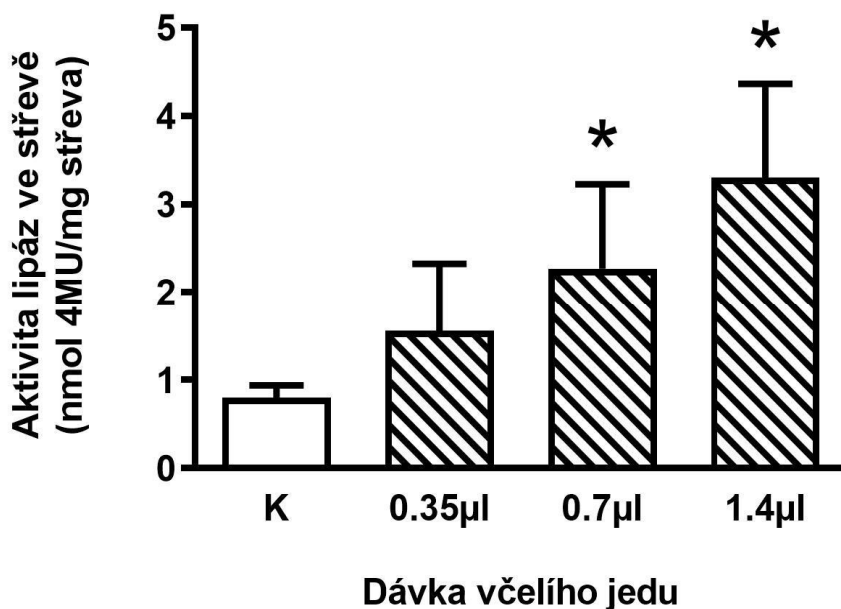
4.3. Vliv včelího jedu na aktivitu trávicích enzymů

V další části práce byl sledován vliv aplikace včelího jedu na aktivitu trávicích enzymů ve střevě. V první sérii pokusů byla měřena proteázová aktivita. Obrázek 6 ukazuje, že aplikace včelího jedu stimulovala aktivitu proteáz. Při dávce 1,42µl včelího jedu byla aktivita proteáz statisticky významně (4,2krát) vyšší než u kontrol. Podobný výsledek byl i u dávky 0,7µl, která zvyšuje aktivitu proteáz 3,5krát. Poslední aplikovaná dávka sice také stimulovala aktivitu proteáz, ale nicméně tato aktivace nebyla statisticky průkazná.



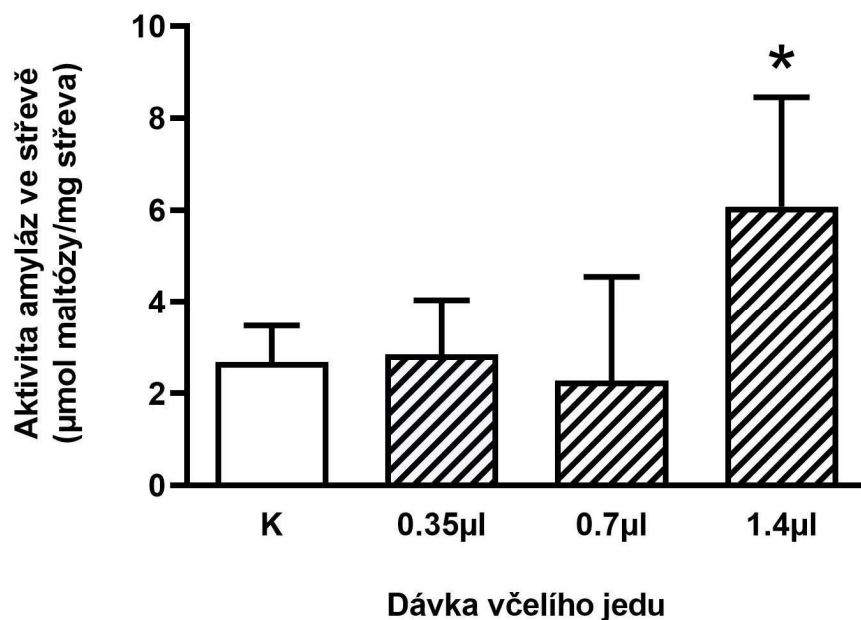
Obr. 6. Vliv injekce 0,35µl, 0,7µl a 1,4µl včelího jedu na aktivitu proteáz ve střevě včely medonosné. Statisticky významné rozdíly na 5 % hladině významnosti, testované pomocí testu jednocestná ANOVA s Dunnettovým post-testem, jsou označeny hvězdičkami; n=8.

Podobný vliv včelího jedu byl zjištěn i u lipáz (Obr. 7), kde dávky 0,7 a 1,4µl statisticky významně stimulovaly aktivitu tohoto enzymu (2,8krát a 4krát).



Obr. 7. Vliv injekce 0,35µl, 0,7µl a 1,4µl včelího jedu na aktivitu lipáz ve střevě včely medonosné. Statisticky významné rozdíly na 5 % hladině významnosti, testované pomocí testu jednocestná ANOVA s Dunnettovým post-testem, jsou označeny hvězdičkami; n=8.

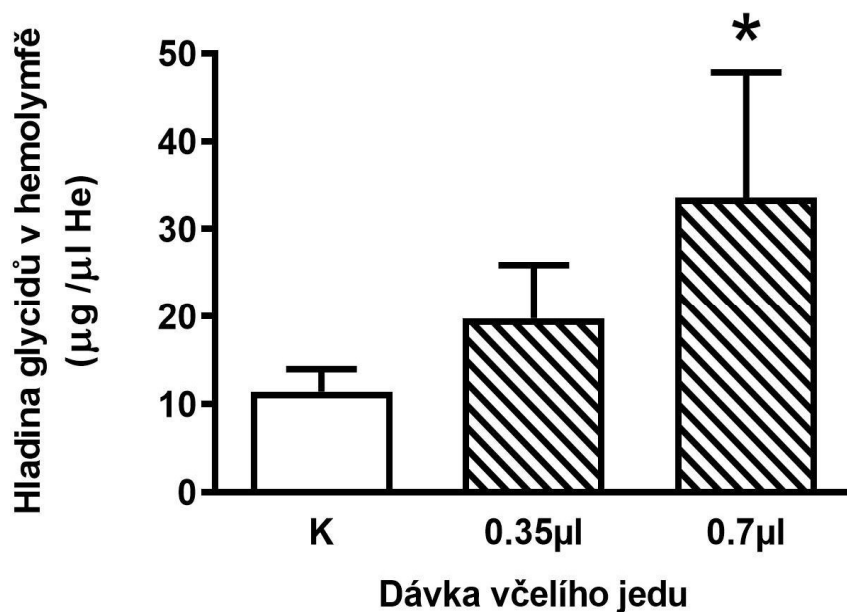
Posledními testovanými enzymy byly amylázy (Obr. 8). Zde bylo zaznamenáno, že nejvyšší testovaná dávka jedu zvyšovala statisticky významně aktivitu asi 2,3krát. Naopak nižší dávky jedu neměly na aktivitu amyláz ve střevě včely žádný vliv.



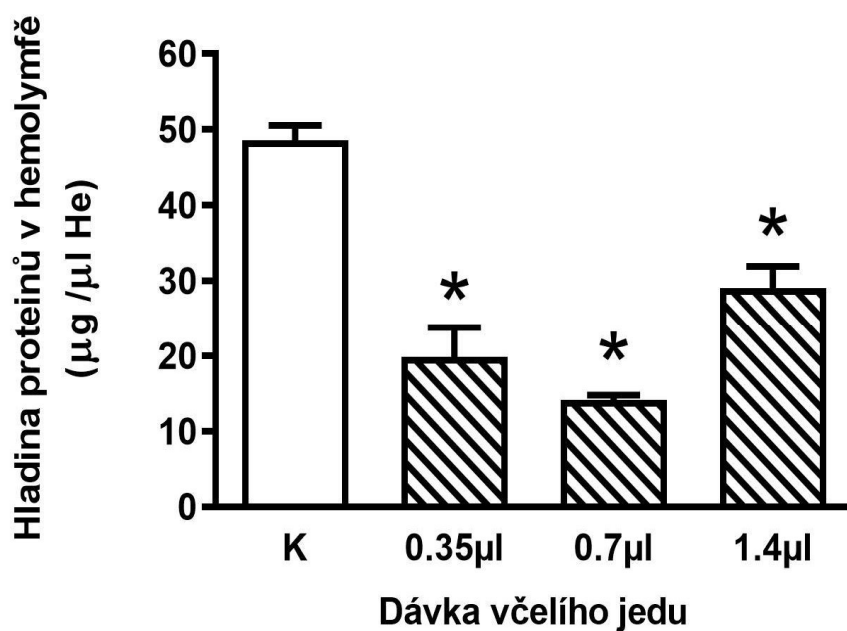
Obr. 8. Vliv injekce 0,35µl, 0,7µl a 1,4µl včelího jedu na aktivitu amyláz ve střevě včely medonosné. Statisticky významné rozdíly na 5 % hladině významnosti, testované pomocí testu jednocestná ANOVA s Dunnettovým post-testem, jsou označeny hvězdičkami; n=8.

4.4 Vliv včelího jedu na hladinu živin v hemolymfě

Hladina živin v hemolymfě může kolísat v závislosti na stavu organismu, který může být ovlivněn stresem, a proto bylo dále zkoumáno, jakým způsobem může aplikovaný včelí jed ovlivnit obsah živin v hemolymfě. Nejprve byly testovány glycidy (viz Obr. 9). Z grafu vyplývá, že dávka 0,7µl signifikantně zvyšovala hladinu glycidů (asi 3krát) ve srovnání s kontrolami. Nejnižší dávka také hladinu glycidů zvyšovala, ale zvýšení není statisticky průkazné. Je zajímavé, že aplikace jedu snižovala hladinu proteinů v hemolymfě. Statisticky významný vliv byl prokázán u všech tří testovaných dávek (Obr. 10), kde nejvyšší účinek byl prokázán u dávky 0,7µl, kde byla hladina snížena asi 3,4krát.

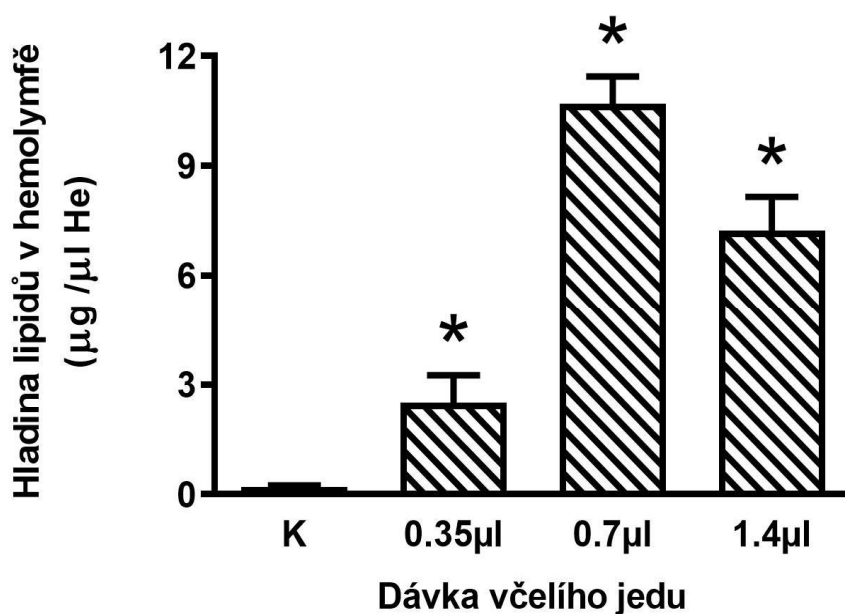


Obr. 9. Vliv injekce 0,35µl a 0,7µl včelího jedu na hladinu glycidů v hemolymfě včely medonosné. Statisticky významné rozdíly na 5 % hladině významnosti, testované pomocí testu jednocestná ANOVA s Dunnettovým post-testem, jsou označeny hvězdičkami; n=4.



Obr. 10. Vliv injekce 0,35µl, 0,7µl a 1,4µl včelího jedu na hladinu proteinů v hemolymfě včely medonosné. Statisticky významné rozdíly na 5 % hladině významnosti testované pomocí testu jednocestná ANOVA s Dunnettovým post-testem, jsou označeny hvězdičkami; n=4.

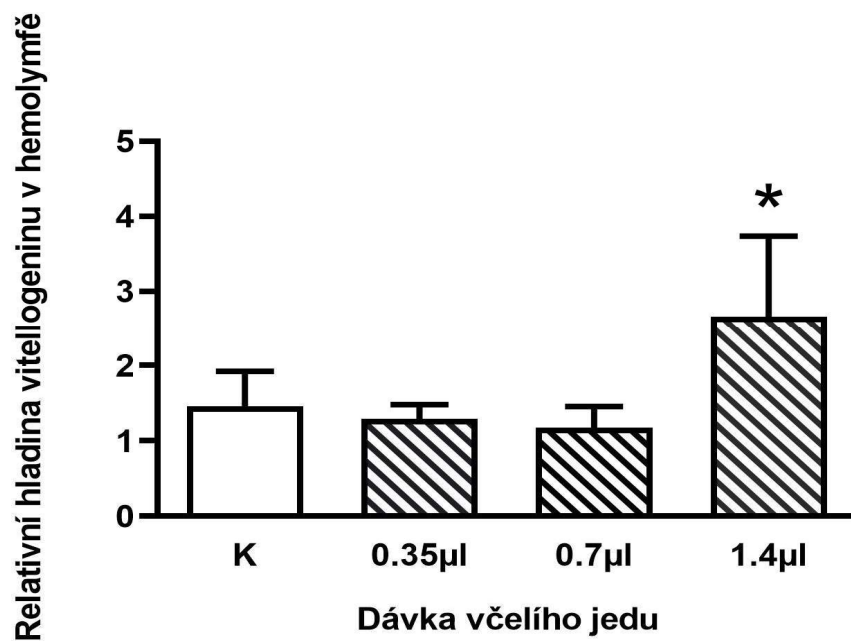
V neposlední řadě byl testován také vliv jedu na hladinu lipidů v hemolymfě. Z Obr. 11 vyplývá, že hladinu lipidů statisticky významně zvyšovaly všechny použité dávky jedu, nicméně nejúčinnější se ukázala dávka 0,7 μ l jedu, kde zvýšení oproti kontrole bylo zhruba 50násobné.



Obr. 11. Vliv injekce 0,35 μ l, 0,7 μ l a 1,4 μ l včelího jedu na hladinu lipidů v hemolymfě včely medonosné. Statisticky významné rozdíly na 5 % hladině významnosti, testované pomocí testu jednocestná ANOVA s Dunnettovým post-testem, jsou označeny hvězdičkami; n=4.

4.5. Vliv včelího jedu na hladinu vitellogeninu v hemolymfě

V této práci jsem se zabývala také změnou hladiny vitellogeninu v hemolymfě po aplikaci včelího jedu, což je zobrazeno na obr. 12. Z tohoto grafu vyplývá, že nejvyšší dávka zvyšuje hladinu vitellogeninu 1,8krát vůči kontrole. U ostatních dávek jedu nebyl statisticky významný účinek prokázán.



Obr. 12. Vliv injekce 0,35µl, 0,7µl a 1,4µl včelího jedu na hladinu vitellogeninu v hemolymfě včely medonosné. Statisticky významný rozdíl na 5 % hladině významnosti, testovaný pomocí testu jednocestná ANOVA s Dunnettovým post-testem, je označen hvězdičkou; n=16.

5. Diskuze

Včela medonosná *A. mellifera L.* se řadí mezi tzv. eusociální hmyz, který žije ve společenstvu, kde má každý jedinec přesně stanovenou úlohu. Během evolučního vývoje se u včel vyvinuly důmyslné obranné strategie, které vedly k mimořádné úspěšnosti tohoto druhu. Mezi nejdůležitější obranné strategie včel patří bez pochyby použití včelího jedu. Ten včely používají nejen proti predátorům, ale i proti cizím jedincům vlastního druhu. Proto je velice zajímavé studovat, jaký vliv má tento jed na včely samotné.

V první fázi této práce bylo důležité vytipovat optimální dávku včelího jedu, která by způsobila úmrtnost (ideálně okolo 20 až 30 %), ale zároveň zanechávala dostatečné množství přeživších jedinců pro následné analýzy. Podle očekávání mortalita narůstala s rostoucí dávkou včelího jedu; pro všechny následujících pokusy jsme se rozhodli testovat fyziologický účinek 0,35 μ l, 0,7 μ l, 1,4 μ l jedu.

V další fázi byl studován vliv včelího jedu na hladinu adipokinetického hormonu v CNS, což se jevílo jako zajímavé, protože AKH patří mezi stresové hormony a očekávalo se, že po aplikaci jedu, a tím vyvolaném stresu, bude hladina AKH kolísat, jak bylo zaznamenáno i u jiných stresorů (Kodrík a kol., 2010). Je zajímavé, že hladina AKH reaguje na stresové situace variabilně. Byly zaznamenány případy, kdy hladina AKH při stresové situaci rostla. Například u ruměnice pospolné (*Pyrrhocoris apterus*) po aplikaci různých insekticidů hladina AKH vzrostla až 3krát oproti kontrolní skupině (Kodrík a kol., 2010; Kodrík a Socha, 2005). Nicméně hladina AKH rostla nejen po aplikaci chemických látek, ale i po aplikaci přírodních toxinů. U švába amerického (*P. americana*), kde byl aplikován jed vosičky lumčíka skladištního (*Habrobracon hebetor*), vzrostla hladina adipokinetických hormonů vůči kontrolní skupině asi 4,5krát, další aplikovaný přírodní toxin destruxin A zvýšil hladinu AKH 3,5krát (Karusová a kol., 2019). Na druhou stranu byl zaznamenán i opačný efekt, kdy se hladina AKH po injikovaném stresoru snižovala. V mé práci došlo ke snížení hladiny AKH po aplikaci včelího jedu až pětinasobně oproti kontrolní skupině. Jedno z možných vysvětlení by mohlo být uvolnění AKH do hemolymfy a jeho transport do cílových tkání. Podobný výsledek byl zaznamenán u ruměnice pospolné, a to po aplikaci Bt toxinu. Výsledná hladina AKH se snížila až pětinasobně oproti kontrole (Broučková, 2020). Lze tedy předpokládat, že se AKH účastní obranných reakcí organismu proti stresu způsobenému toxiny, ale je zřejmé, že záleží na cílovém druhu hmyzu, použitém toxinu a jeho aplikované dávce.

Lze také předpokládat, že včelí jed a s ním vyvolaný stres vyvolá v těle oběti také rozkolísání metabolických funkcí. Ukázalo se, že ovlivňuje také trávící procesy. V mé práci došlo ke stimulaci všech trávicích enzymů, tedy proteáz, lipáz i amyláz, i když intenzita stimulace se

lišila podle použité dávky jedu. U včel je trávení ovlivněno mnoha vnějšími i vnitřními faktory, mimo jiné skladbou potravy. Ricigliano a kol. (2017) například zjistili, že včely krmené potravou, která neobsahovala pyl, vykazovaly nižší hladinu glykosidáz, než tomu bylo u kontrol. U švába amerického znamenala aplikace včelího jedu stimulaci proteáz, ale jen v malé míře, u ostatních měřených enzymů (amylázy, lipázy) změna zaznamenaná nebyla (Bodláková, 2020). Podobný výsledek byl zaznamenán i po aplikaci jedu vosičky (*H. hebetor*), který neměl na hladinu enzymů ve střevě švába amerického vliv (Karbusová a kol., 2019). Dalším důkazem, že jed vyvolal intenzivní stres v těle včel, bylo kolísání živin v hemolymfě. V mé práci bylo zjištěno, že včelí jed stimuluje hladinu energetických metabolitů glycidů (až 3krát) a lipidů (až 50krát), což je logické, protože tyto živiny slouží jako zdroj energie, která se spotřebovává při obraně organismu vůči stresu. Další měřenou živinou byly proteiny, v mé práci se ukázalo, že došlo k poklesu této hladiny. Tento výsledek je překvapivý, ale možná ho lze vysvětlit zapojením a následným spotřebováním proteinů v obranných reakcích. Dokonce i v jiných studiích byla zaznamenaná změna hladiny živin v hemolymfě po aplikaci přírodního toxinu. Aplikace entomopatogenních hlístic *Steinernema carpocapsae* vedla ke zvýšení hladiny lipidů v hemolymfě u ruměnice pospolné (Ibrahim a kol., 2017). Obecně je mobilizace energetických zásob v těle hmyzu řízena AKH. K tomu dochází převážně, když je organismus ve stresu, což by mohlo korespondovat s kolísáním hladiny AKH v CNS zjištěné v této bakalářské práci.

Jak bylo zmíněno v Úvodu, zdá se, že jistou roli v hmyzích obranných reakcích hraje vitellogenin – jeho role však není zcela jasná. Moje výsledky ukázaly, že aplikace jedu vedla ke zvýšení hladiny vitellogeninu v hemolymfě včel. Ke kolísání hladiny vitellogeninu dochází u hmyzu i po aplikaci jiných toxinů. Toto kolísání bylo zaznamenáno i u včel, a to jako odpověď na přítomnost grampozitivních a gramnegativních bakterií, což vedlo k velice silné antibakteriální odpovědi. Tato skutečnost dokazuje, že vitellogenin je schopný vázat bakteriální buňky a zničit je (Singh a kol., 2013). Velice zajímavým zjištěním byla odpověď vitellogeninu na grampozitivní bakterii *P. larvae*. Její přítomnost stimulovala hladinu vitellogeninu, což by se dalo v praxi využít, jelikož tato bakterie je zodpovědná za nejzávažnější onemocnění – mor včelího plodu (Salmela a kol., 2015). Dále bylo zjištěno, že mikrosporidie *Nosema ceranae* také výrazně zvyšovala hladinu vitellogeninu u včelích dělnic (BenVau a Nieh, 2017).

Kolísání hladiny vitellogeninu bylo zaznamenáno také po aplikaci entomopatogenních hlístic a hub na dospělce *P. apterus* (Kodrík a kol., 2019). Je zajímavé, že u samců došlo k nárůstu hladiny vitellogeninu a u samic naopak k jejímu poklesu. Je to poněkud komplikovanější

fenomén, který souvisí s celkovou hladinou vitellogeninu v těle a s nezbytným výdejem energie, kterou je jedinec nucen věnovat na eliminaci stresu. Každopádně je zřejmé, že vitellogenin hraje významnou roli v imunitě hmyzu, nicméně pro plné pochopení jeho funkce v obranných reakcích bude třeba tento fenomén dále podrobně studovat.

6. Závěry

Cílem této práce bylo sledování fyziologických reakcí u včely medonosné po aplikaci včelího jedu. Výsledky ukazují následující zjištění:

1. Aplikace včelího jedu zvyšuje mortalitu včely medonosné *A. mellifera*.
2. Hladina AKH v CNS vykazuje po aplikaci jedu značný pokles oproti kontrolní skupině.
3. Aktivita střevních enzymů (proteázy, lipázy, amylázy) se po aplikaci jedu zvyšuje.
4. Hladina glycidů a lipidů v hemolymfě po aplikaci jedu roste, oproti tomu hladina proteinů se snižuje.
5. Množství vitellogeninu v hemolymfě se po aplikaci včelího jedu zvyšuje.

7. Seznam použité literatury

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

Bernfeld, P. (1955). *Amylases, α and β* . In: Colowick, S. P., Kaplan, N. O. (Eds.). Academic Press, New York. Methods in Enzymology 1, 149–158.

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

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

BodlÁková, K., Jedlička, P., KodrÍk, D. (2017). *Adipokinetic hormones control amylase activity in the cockroach (Periplaneta americana) gut*. Insect Science 24, 259–269.

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

Broučková, T. (2020). *Hmyzí antistresové reakce vůči přírodním toxinům*. Bakalářská práce (Bc.). Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. Přírodovědecká fakulta.

Carol, N. V., Longley, R. W., Roe, J. H. (1956). *The determination of glycogen in liver and muscles by use of anthrone reagent*. The Journal of Biological Chemistry 220, 583-593.

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

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

Diemer, I. (1997). *Včelaření jako hobby*. Granit. ISBN 80-85805-510.

Engels, W., Kaatz, H., Zillikens, A., Simões, Z. L., Trube, A., Braun, R., Dittrich, F. (1990). *Honey bee reproduction: vitellogenin and caste-specific regulation of fertility*. *Advances Invertebrate Reproduction* 5, 495–502.

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

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

Hightower, L. E. (1991). *Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity*. *Cell* 66, 191-197.

Ibrahim, E., Hejníková, M., Shaik, H. A., Doležel, D., Kodrík, D. (2017). *Adipokinetic hormone activities in insect body infected by entomopathogenic nematode*. *Journal of Insect Physiology* 98, 347–355.

Karbusová, N., Gautam, UK., Kodrík, D. (2019). *Effect of natural toxins and adipokinetic hormones on the activity of digestive enzymes in the midgut of the cockroach *Periplaneta americana**. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 101, e21586.

Karlson, P. (1981). *Základy biochemie*. 3. přeprac. vyd. Praha: Academia. ISBN 104-21-852.

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

Kodrík, D., Socha, R. (2005). *The effect of insecticide on adipokinetic hormone titre in the insect body*. *Pest Management Science*, 61(11), 1077–1082.

Kodrík, D., Bártů, I., Socha, R. (2010). *Adipokinetic hormone (Pyrap-AKH) enhances the effect of a pyrethroid insecticide against the firebug *Pyrrhocoris apterus**. *Pest Management Science*, 66(4), 425–431.

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

Kodrík, D., Ibrahim, E., Gautam, U. K., Čapková-Frydrychová, R., Bednářová, A., Křišťůfek, V., Jedlička, P. (2019). *Changes in vitellogenin expression caused by nematodal and fungal infections in insects*. *Journal of Experimental Biology*. Article no. jeb202853.

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

Moreno, M., Giralt, E. (2015). *Three Valuable Peptides from Bee and Wasp Venoms for Therapeutic and Biotechnological Use: Melittin, Apamin and Mastoparan*. *Toxins* 7, 1126-1150.

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

Rejnič, J., Schuchman, O. (1995). *Ovocinárstvo a včelárstvo*. 2.vyd. Bratislava: Príroda. ISBN 80-07-00737-7.

Ricigliano, VA., Fitz, W., Copeland, DC. (2017). *The impact of pollen consumption on honey bee (Apis mellifera) digestive physiology and carbohydrate metabolism*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, e21406.

Roberts, I. M. (1985). *Hydrolysis of 4-methylumbelliferyl butyrate: a convenient and sensitive fluorescent assay for lipase activity*. *Lipids* 20, 243-247.

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

Sandberg, B. (1978). *Improved solid phase synthesis of apamin, the principal neurotoxin of bee venom: structure-function studies based on synthetic analogues*. Uppsala: Bengdt E. B. Sandberg, Acta Universitatis Upsaliensis.

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. Journal 8, e73005.

Socha, R., Šula, J., Kodrík, D. (2004). *Wing morph-related differences in developmental pattern of accessory gland proteins in adult males of Pyrrhocoris apterus (L.) and their endocrine control*. Journal of Insect Physiology 50, 893–900.

Stoscheck, C. M. (1990). *Quantitation of proteins*. Academic Press, Inc. In: Methods in Enzymology 182, 50-68.

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

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

Veselý, V., Titěra, D., Kamler, F. (1999). *Základy včelaření*. 2.Vyd., Praha: Institut výchovy a vzdělávání Ministerstva zemědělství ČR. ISBN 80-7105-189-6.

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

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