

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Vývoj metody pro detekci a kvantifikaci  
hmyzích hormonů**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Bc. Eliška Moravcová</b>
Studijní program:	N0512A130009 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Mgr. Jiří Danihlík, Ph.D.</b>
Konzultant práce:	Mgr. Jana Jemelková, Ph.D.
Rok:	2024

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

V Olomouci dne

.....

Podpis autora

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Eliška Moravcová
Název práce	Vývoj metody pro detekci a kvantifikaci hmyzích hormonů
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Jiří Danihlík, Ph.D.
Konzultant práce	Mgr. Jana Jemelková, Ph.D.
Rok obhajoby	2024

### Abstrakt

Endokrinní soustava hmyzu se podílí na regulaci biochemických a fyziologických procesů v těle hmyzu. Její hlavní funkcí je sekrece ecdysteroidů, juvenilních hormonů a neuropeptidických hormonů.

Juvenilní hormon je seskviterpenoidní látka syntetizovaná v *corpora allata*. Podílí se na metamorfóze hmyzu, reguluje syntézu vitellogeninu a má vliv na dlouhověkost včel, polymorfismus a tvorbu kast ve včelstvu.

Diplomová práce je věnována optimalizaci metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s ionizací elektrosprejem a analyzátozem doby letu (UHPLC – ESI–QTOF) pro detekci a kvantifikaci juvenilního hormonu III. Pro chromatografickou separaci byla zvolena Arion C<sub>8</sub> HPLC kolona (150 × 2,1 mm) s mobilní fází tvořenou A: voda + 10 μmol.l<sup>-1</sup> mravenčan amonný + 0,1% kyselina mravenčí; B: 90% acetonitril + 0,1% kyselina mravenčí. Eluce probíhala gradientově s průtokem 400 μl/min. Jako vhodné rozpouštědlo pro JH III byl zvolen 90% acetonitril.

Pro kvantifikaci JH III byl zvolen jako vnitřní standard methopren. Byla změřena MS spektra pro methopren, přičemž nejvyšší intenzitu měl pik pro fragment methoprenu o m/z 279,23. Dalším dostupným interním standardem pro kvantifikaci JH III byl deuteriem značený JH-D<sub>3</sub>, pro který byly taktéž změřeny MS spektra. JH-D<sub>3</sub> se v průběhu ionizace rozpadal na neznačený fragment o m/z 235,17, což odpovídá i fragmentu neznačeného JH III, tudíž JH-D<sub>3</sub> nemohl být využit jako interní standard. Proto byl pro následnou kvantifikaci zvolen methopren jako interní standard.

Juvenilní hormon III byl izolován z včelí hemolymfy směsí extrakčních činidel isooktan-methanol. Pro extrakci byly použity LB silylované mikrozskumavky a vialky. Výtěžnost pro plochy píku IS a JH III po extrakci byla v průměru 55 ± 7,5 % pro IS a 87 ± 4,5 % pro JH III.

JH III byl kvantifikován z hemolymfy pomocí externě sestavené kalibrační řady a metodou standardního přídatku. Průměrná hodnota JH III ve včelí hemolymfě byla 230,5 ± 30,5 pg.μl<sup>-1</sup>.

V praktické části se podařilo optimalizovat a částečně validovat metodu UHPLC – ESI-QTOF pro detekci a kvantifikaci juvenilního hormonu III z hemolymfy

*Apis mellifera*. Metodu je třeba dále validovat a verifikovat, aby mohla posloužit pro další studium JH III u *A. mellifera*.

Klíčová slova	Juvenilní hormon III, ekdysteroidy, LCMS, hormony
Počet stran	70
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Eliška Moravcová
Title	Development of method for detection and quantification of insect's hormones
Type of thesis	Diploma
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Jiří Danihlák, Ph.D.
Consultant	Mgr. Jana Jemelková, Ph.D.
The year of presentation	2024

### Abstract

The insect endocrine system is involved in the regulation of biochemical and physiological processes in the insect body. Its main function is the secretion of ecdysteroids, juvenile hormones and neuropeptide hormones.

Juvenile hormone is a sesquiterpenoid substance synthesized in the *corpora allata*. It is involved in insect metamorphosis, regulates vitellogenin synthesis, and influences honeybee longevity, polymorphism, and caste formation in the colony.

This thesis is devoted to the optimization of a high-performance liquid chromatography method coupled with electrospray ionization and time-of-flight analyzer (UHPLC-ESI-QTOF) for the detection and quantification of juvenile hormone III. For chromatographic separation was chosen Arion C<sub>8</sub> HPLC column (150 × 2,1 mm) with a mobile phase consisting of A: water + 10 μmol.l<sup>-1</sup> ammonium formate + 0.1% formic acid; B: 90% acetonitrile + 0.1% formic acid. The elution was carried out in a gradient manner with a flow rate of 400 ml/min. 90% acetonitrile was chosen as a suitable solvent for JH III.

Methoprene was chosen as an internal standard for the quantification of JH III. MS spectra for methoprene were measured, with the highest intensity peak for the methoprene fragment m/z 279.23. Another available internal standard for JH III quantification was deuterium-labeled JH-D<sub>3</sub>, for which MS spectra were also measured. During ionization JH-D<sub>3</sub> fragmented to an unlabeled fragment m/z 235,17, which also corresponds to the fragment of unlabeled JHIII, thus JH-D<sub>3</sub> could not be used as an internal standard. Therefore, methoprene was chosen as the internal standard for quantification.

Juvenile hormone III was extracted from honeybee hemolymph with a mixture of iso-octane-methanol extraction reagents. LB silylated microtubes and vials were used for extraction. The recoveries for the peak areas of IS and JH III after extraction averaged 55 ± 7,5% and 87 ± 4.5% for IS and JH III.

JH III was quantified from haemolymph using an externally constructed calibration curve and the standard addition method. The mean value of JH III in bee haemolymph was 230.5 ± 30.5 pg. μl<sup>-1</sup>.

In the practical part, UHPLC-ESI-QTOF method for the detection and quantification of juvenile hormone III from *Apis mellifera* hemolymph was optimized and partially validated. The method needs to be further validated and verified to serve for further studies of JH III in *A. mellifera*.

Keywords	Juvenile hormone III, ecdysteroids, LCMS, hormones
Number of pages	70
Number of appendices	0
Language	Czech

## **Poděkování**

Tímto bych ráda poděkovala vedoucímu mé diplomové práce Mgr. Jiřímu Danihlíkovi, Ph.D. a Mgr. Janě Jemelkové, Ph.D. za čas, vstřícný přístup a cenné rady, které mi věnovali při zpracování této práce. Také děkuji katedře biochemie, která mi umožnila práci na experimentální části.

## OBSAH

CÍLE PRÁCE .....	10
1 ÚVOD .....	11
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY .....	13
2.1 ENDOKRINNÍ SOUSTAVA HMYZU .....	13
2.2 JUVENILNÍ HORMONY .....	15
2.2.1 Metabolismus juvenilního hormonu .....	15
2.2.2 Receptor pro juvenilní hormon .....	17
2.2.3 Účinky juvenilního hormonu na hmyz.....	17
2.2.4 Dlouhověkost včel.....	19
2.2.4.1 Letní a zimní generace včel.....	19
2.2.4.2 JH III a jeho vliv na věkový polyethismus ve včelstvu .....	20
2.2.4.3 Vitellogenin.....	21
2.3 EKDYSTEROIDY .....	23
2.3.1 Biosyntéza .....	23
2.3.2 Degradace ekdysteroidů .....	25
2.3.3 Receptor pro ekdysteroidní hormony .....	26
2.3.4 20– hydroxyekdyson a účinky ekdysteroidů.....	26
2.4 NEUROHORMONY .....	28
2.4.1 Protoracikotropní hormon .....	28
2.4.2 Allotropiny a allostatiny.....	29
2.4.3 Adipokinetický hormon .....	29
2.4.4 Další neurohormony .....	30
2.5 VÝVOJ METODY PRO DETEKCI A KVANTIFIKACI JUVENILNÍHO HORMONU III	31
2.5.1 Vývoj metody .....	31
2.5.2 Validace metody.....	31
2.5.2.1 Selektivita.....	31
2.5.2.2 Specifita.....	32
2.5.2.3 Výtěžnost.....	32
2.5.2.4 Kalibrační křivka a rozsah .....	32
2.5.2.5 Přenos .....	33
2.5.2.6 Matricové efekty .....	33
2.5.2.7 Přesnost a preciznost .....	34
2.5.2.8 Stabilita .....	34
2.5.2.9 Reprodukovatelnost.....	35
2.5.3 Metoda HPLC/MS pro detekci a kvantifikaci juvenilního hormonu III .....	35
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	38
3.1 MATERIÁL .....	38
3.1.1 Biologický materiál .....	38
3.1.2 Chemikálie .....	38
3.1.3 Použité roztoky a média .....	38
3.2 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ .....	38
3.3 METODY .....	39
3.3.1 Systémové nastavení hmotnostní spektrometrické analýzy .....	39
3.3.2 Systémové nastavení HPLC .....	40
3.3.3 Optimalizace výběru vhodné kolony a mobilní fáze.....	40
3.3.4 Vnitřní standard.....	41



3.3.6	Extrakce JH III z <i>Apis mellifera</i> .....	42
3.3.7	Odběr hemolymfy .....	43
3.3.8	Extrakce JH III z celé včely .....	43
3.3.9	Extrakce JH III z hemolymfy .....	43
3.3.10	Optimalizace vhodného spotřebního materiálu.....	44
3.3.11	Stanovení návratnosti metody .....	44
3.3.12	Kvantifikace JH III pomocí metody standardního přídatku.....	45
4	VÝSLEDKY .....	46
4.1	MS SPEKTRUM PRO JH III .....	46
4.2	OPTIMALIZACE POUŽITÍ VHDNÉ KOLONY A MOBILNÍ FÁZE PRO DETEKCI A KVANTIFIKACI JH III .....	46
4.3	OPTIMALIZACE VHDNÉHO ROZPOUŠTĚDLA PRO JH III .....	48
4.4	VNITŘNÍ STANDARD .....	49
4.4.1	Chromatografické chování a MS spektrum pro značený JH-D <sub>3</sub> .....	49
4.4.2	Chromatografické chování a MS spektrum pro methopren .....	51
4.5	KALIBRAČNÍ ŘADA.....	52
4.6	OPTIMALIZACE VHDNÉHO SPOTŘEBNÍHO MATERIÁLU PRO EXTRAKCI JH III Z <i>APIS MELLIFERA</i> A ZPRACOVÁNÍ ODEBRANÉ HEMOLYMFY .....	54
4.7	NÁVRATNOST METODY .....	55
4.8	KVANTIFIKACE JH III POMOCÍ METODY STANDARDNÍCH PŘÍDAVKŮ .....	55
5	DISKUSE .....	57
6	ZÁVĚR .....	61
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	63
8	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	69

## CÍLE PRÁCE

- Příprava literárního přehledu o poznatcích o endokrinní soustavě hmyzu.
- Zpracování literární rešerše o hmyzích hormonech se zaměřením na ekdysteroidy, juvenilní hormony a peptidické neurohormony.
- Příprava přehledu metod detekce a kvantifikace hmyzích hormonů.
- Optimalizace metody izolace hormonů z hmyzích tkání.
- Optimalizace detekce a kvantifikace juvenilního hormonu III pomocí UHPLC–ESI-QTOF.

# 1 ÚVOD

Endokrinní soustava hmyzu je součástí neurokrinní soustavy. Je tvořena neurosekretickými buňkami mozku sekretujícími neurohormony, *corpora cardiaca*, která produkuje adipokinetické hormony a neurohormony, a *corpora allata*, což je párový orgán produkující juvenilní hormony. Dále se sem řadí prothorakální žlázy, které syntetizují ekdysteroidy, neurosekretické buňky ganglií, endokrinní buňky střeva, epitracheální buňky a gonády (Klowden, 2008). Endokrinní soustava se podílí na regulaci biochemických a fyziologických procesů v těle. Slouží ke komunikaci mezi orgány, tkáněmi a mezi organismy navzájem. Na rozdíl od nervové soustavy, která působí rychle a krátkodobě, je založena na pomalé a dlouhodobé komunikaci mezi buňkami. Hlavní funkcí endokrinní soustavy je sekrece hormonů. Hormony v těle hmyzu ovlivňují růst, vývoj, rozmnožování, svlékání, osmoregulaci, diurézu, chování a komunikaci. Endokrinní soustava vylučuje 3 druhy hormonů: ekdysteroidy, juvenilní hormony a peptidické hormony (Klowden, 2008; Nijhout, 1998; Orchard et Lange, 2024).

Ekdysteroidy jsou syntetizovány v prothorakálních žlázách a ovariích samic z cholesterolu. Syntéza je řízena prothoracikotropním hormonem, který aktivuje prothorakální žlázy a stimuluje syntézu a uvolňování ekdysteroidů (Gilbert et al., 1977). Jedná se o svlékácí hormony, které uplatňují svojí funkci v embryogenezi a larválním vývoji (Gilbert et al., 1980). Dále ovlivňují reprodukci hmyzu – u samic ovlivňují zrání oocytů a u samců tvorbu spermatoforu (Hagedorn et al., 1975; Gilliot et Ismail, 1995). Mezi ekdysteroidy se řadí např. ekdyson, což je prohormon svlékácího hormonu 20 – hydroxylekdysonu, jež má zásadní roli při svlékání a metamorfóze hmyzu (Lafont et al., 2021).

Juvenilní hormony (JH) jsou seskviterpenoidní látky, k jejichž syntéze dochází v párovém orgánu *corpora allata*, odkud se následně uvolňují do hemolymfy (Gilbert et al., 2000). Existuje několik druhů, včela medonosná má konkrétně juvenilní hormon III, který je nejvíce rozšířen u hmyzu (Fluri et al., 1982). Juvenilní hormony se podílejí na metamorfóze a rozmnožování hmyzu. Udržují larvu v juvenilním stádiu, čímž zabraňují nástupu metamorfózy hmyzu v dospělého jedince do té doby, než larva doroste. Ke konci larválního stádia dojde k poklesu syntézy JH a spustí se metamorfóza v dospělce. Juvenilní hormony regulují reprodukci samic hmyzu (Amdam et al., 2003). Nižší hladiny JH III stimulují genovou exprese vitellogeninu v tukovém tělese, který je následně transportován do zrajících vajíček samic (Corona et al., 2007). U včelích larev

hraje důležitou roli ve vývoji ovaríí. Také ovlivňuje polymorfismus a tvorbu kast ve včelstvu (Amdam et al., 2003).

Peptidické neurohormony jsou syntetizovány neurosekretickými buňkami mozku nebo jiných částí CNS, odkud jsou dále do těla rozváděny hemolymfou. Podílejí se na svalové kontrakci, ovlivňují chování hmyzu a diurézu. Je jich nespočetné množství a řadí se sem např. adipokinetické hormony, allotropiny, allostatiny, diuretický hormon, proctolin a diapauzní hormon (Klowden, 2008).

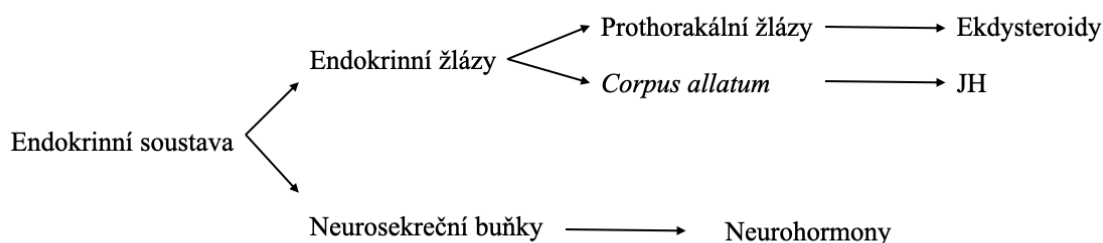
Juvenilní hormony, ekdysteroidy a neuropeptidické hormony lze detekovat a kvantifikovat pomocí kapalinové chromatografie, plynové chromatografie, hmotností spektrometrie, radioimunoanalýzou nebo imunochemicky metodou ELISA.

Diplomová práce je věnována optimalizaci metody UHPLC-ESI-QTOF pro detekci a kvantifikaci juvenilního hormonu III a vývoji metody pro izolaci juvenilního hormonu z tkání *Apis mellifera*. Studium juvenilního hormonu je důležité, abychom pochopili princip dlouhověkosti a krátkověkosti včel a jaký vliv na proces stárnutí včel má právě juvenilní hormon. Každoročně totiž dochází k velkému úhynu včelstev. Vzhledem k tomu, že včely tvoří 90 % všech opylovačů rostlin, je cílem zabránit velkým úhynům včelstev a prodloužit životnost jednotlivých včel.

## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 Endokrinní soustava hmyzu

Endokrinní soustava hmyzu (obr. 1) je součástí tzv. neuroendokrinní soustavy, která je tvořena nervovou a endokrinní soustavou. V rámci neuroendokrinní soustavy dochází k vzájemné spolupráci mezi hormony a nervovým systémem. Neuroendokrinní soustava se skládá z mozku a přilehlých žláz, mezi které patří neurosekreční buňky mozku sekretující neurohormony, *corpora cardiaca*, která produkuje neurohormony, a *corpora allata* (CA) produkující juvenilní hormony. Dále se sem řadí prothorakální žlázy, které syntetizují ekdysteroidy, neurosekretické buňky ganglií, endokrinní buňky střeva, epitracheální buňky a gonády (Klowden, 2008).



Obrázek 1 Endokrinní soustava hmyzu. Upraveno podle Klowden (2008).

Prothorakální žláza je u dvoukřídlého hmyzu tvořena bilaterálním shlukem polymorfonukleárních buněk obklopujících průdušnici. Buňky mají velké intracelulární prostory, malý Golgiho komplex a endoplazmatické retikulum. Velikost a zastoupení jádra, mitochondrie a lysozomů se odvíjí podle sekreční aktivity žlázy (Dorn et Romer, 1976; Orchard et Lange, 2024). Tato žláza se nachází v prvním hrudním segmentu zvaném prothorax (Bollenbacher et al., 1975; Gilbert et al., 1997). Hlavní funkcí prothorakální žlázy je syntéza ekdysteroidů v embryonálním a larválním vývoji hmyzu (Bollenbacher et al., 1975). Po přeměně v dospělého jedince prothorakální žlázy u většiny hmyzu atrofují a zanikají. Jejich funkci pak přebírají jiné orgány (Belles, 2020; Lafont et al. 2012).

*Corpora allata* je párový orgán nacházející v zadní části hlavy hmyzu či ve výjimečných případech se může nacházet i v thoraxu. Obvykle je vejčitého nebo kulatého tvaru, záleží na druhu hmyzu (Tobe et Stay, 1985). CA je inervována axony

neurosekrečních buněk a neurony v mozku. Jedná se o endokrinní žlázu, jejíž hlavní funkcí je syntéza a sekrece juvenilního hormonu, která je řízena allostatinou a allotropinou (Gilbert et al., 2000).

*Corpora cardiaca* je hlavní neurohemální orgán, jehož funkcí je sekrece neuropeptidů, mezi které patří například prothoracikotropní hormon nebo adipokinetické hormony. Nachází se v hlavové části za mozkiem, se kterým je propojena třemi páry nervů. Obsahuje zakončení axonů z laterálních a mediálních neurosekrečních buněk mozku. Může být samostatná (*corpus cardiacum*) nebo v páru (*corpora cardiaca*). Skládá se ze žlázového a vnějšího laloku. U dvoukřídlého hmyzu je společně s prothorakální žlázou a CA součástí prstencové žlázy (Klowden, 2008; Raabe, 1982).

Endokrinní soustava se podílí na regulaci biochemických a fyziologických procesů v těle. Slouží ke komunikaci mezi orgány, tkáněmi a mezi organismy navzájem. Na rozdíl od nervové soustavy, která působí rychle a krátkodobě, je založena na pomalé a dlouhodobé komunikaci mezi buňkami. Hlavní funkcí endokrinní soustavy je sekrece hormonů (Klowden, 2008).

Hormony jsou látky produkované endokrinní soustavou a slouží k přenosu informací v organismu. Zároveň mají schopnost zasahovat do dějů v buňce a regulovat je. Dělíme je na tkáňové hormony, které jsou produkovány buňkami prostou difúzí a hormony produkované endokrinními žlázami (Nijhout, 1998). Hormony v těle hmyzu ovlivňují růst, vývoj, embryogenezi, rozmnožování, svlékání, diapauzu, osmoregulaci, diurézu, chování a komunikaci. Endokrinní soustava vylučuje 3 druhy hormonů: ekdysteroidy, juvenilní hormony a peptidické hormony (Klowden, 2008; Orchard et Lange, 2024).

## 2.2 Juvenilní hormony

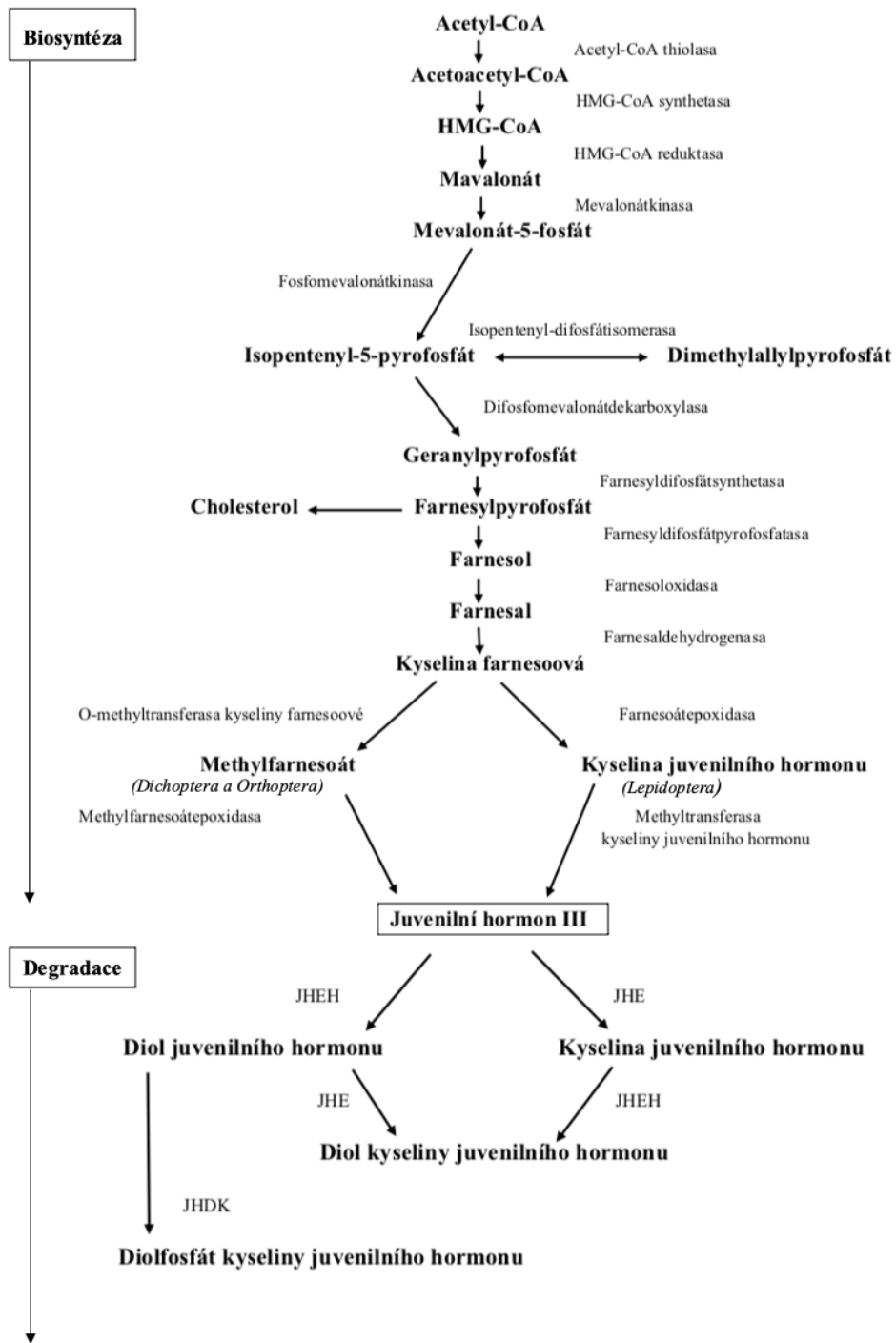
Juvenilní hormony (JH) jsou seskviterpenoidní látky lipofilní povahy. U hmyzu plní různé funkce. Mají vliv na rozmnožování, metamorfózu, diapauzu či polymorfismus hmyzu. U včel se dále např. podílí na tvorbě kast a dlouhověkosti včel (Amdam et al., 2003). Existuje několik druhů juvenilního hormonu. Včela medonosná, stejně jako většina hmyzu, má JH III (Fluri et al., 1982).

### 2.2.1 Metabolismus juvenilního hormonu

Juvenilní hormon III je syntetizován v párovém orgánu *corpora allata*. Syntéza JH III je hormonálně regulována neuropeptidickými hormony – allotropiny a allostatiny (Gilbert et al., 2000). Juvenilní hormon je syntetizován (Obr. 2) z acetyl-CoA skrze mevalonátovou dráhu, jejímž výsledkem je vznik farnesylpyrofosfátu. Sledem několika následujících biosyntetických reakcí vzniká kyselina farnesová a z ní nakonec juvenilní hormon III (Chanchay et al., 2019; Noriega et al., 2014). Vzniklý hormon se uvolňuje do hemolymfy, kde se váže na binding protein (JHBP), který kolem něj tvoří ochranný hydrofobní obal, a je transportován do cílové tkáně (Kolodziejczyk et al., 2008).

JH III je degradován dvěma esterasami (Obr. 2) – esterasou juvenilního hormonu (JHE) v hemolymfě nebo epoxyhydrolasou juvenilního hormonu (JHEH) ve tkáních. JHEH katalyzuje JH III na diol juvenilního hormonu, který je pak působením JHE přeměněn na diol kyseliny juvenilního hormonu nebo působením kinasy diolu juvenilního hormonu (JHDK) na diolfosfát kyseliny juvenilního hormonu. Další možností je přeměna JH III za přítomnosti JHE na kyselinu juvenilního hormonu a následně pomocí JHEH vzniká opět diol kyseliny juvenilního hormonu (Chanchay et al., 2019).

Diol kyseliny juvenilního hormonu a diolfosfát kyseliny juvenilního hormonu jsou biologicky neaktivní látky, které jsou vylučovány ven z těla malpigickými trubicemi (Erley et al., 1975; Grieneisen et al., 1995)



Obrázek 2 Metabolismus JH III – biosyntéza a degradace JH III. Nakresleno podle Chanchay et al., 2019; Noriega et al., 2014.



## 2.2.2 Receptor pro juvenilní hormon

Prvním kandidátem pro JH je ultraspiracle (USP) jaderný receptor. Tento receptor tvoří heterodimer s ekdyzonovým receptorem (EcR) (Jones et al., 2006;) Druhým kandidátem pro receptor juvenilního hormonu je jaderný intracelulární methopren tolerantní protein (Met) z rodiny bHLH-PAS. Tento receptor byl poprvé izolován z mutantního kmene *Drosophila* (Wilson et Fabian, 1986). Met specificky váže JH a jeho napodobeniny (např. methopren) skrze C-terminální doménu PAS (Charles et al., 2011).

Dalším kandidátem na intracelulární receptor pro JH je *Drosophila melangaster* germ cell exprimed (Gce) receptor (Jindra et al., 2015).

Pro rodinu proteinů bHLH-PAS je typická helix-otočka-helix struktura. Tyto proteiny obsahují e-box vazebné prvky JHREs, které rozpoznávají e-boxy vázané jinými proteiny. (Kewley et al., 2014). JHERs obsahují e-box se sekvencí CACGTG (Li et al., 2014). Dimerizované bHLH-PAS proteiny pak vytváří funkční komplexy vázající DNA (Kewley et al., 2014).

Vazba JH na Met/Gce receptor iniciuje v jádře dimerizaci s Tai proteinem skrze bioaktivátor steroidního receptoru BFtR-F1 (FISC). Vzniklý komplex se váže na JHERs na cílových genech Kr-h1 (Krüppelův homolog) a iniciuje jejich transkripci (Jindra et al., 2015; Li et al., 2014). Protein Tai nemusí vždy dimerizovat pouze s JH. Je schopný dimerizovat i s jinými jadernými receptory jako je např. ekdyteroidový receptor EcR (Bai et al., 2000).

Membránový receptor nebyl doposud identifikován. Nicméně se jedná o receptor spřažený s fosfolipasou c (PLC), která je aktivována po navázání JH na receptor. To vede k intracelulárnímu zvýšení IP<sub>3</sub>, diacylglycerolu a vápenatých kationtů. Vápenaté ionty působí na kalmodulin/Ca<sup>2+</sup> dependentní kinasu (CaMK II). Následně se komplex Met - Tai fosforyluje a dochází k aktivaci transkripce cílových genů (Dubrovsky et Bernardo, 2014; Jindra et al., 2015; Liu et al., 2015)

## 2.2.3 Účinky juvenilního hormonu na hmyz

Juvenilní hormon má několik účinků na hmyz. Mezi nejdůležitější funkce JH se řadí jeho vliv na metamorfózu a rozmnožování hmyzu. Podílí se na polyethismu a tvorbě kast ve včelstvu a u některého hmyzu také reguluje mateřskou diapauzu (Amdam et al., 2003; Mukai et al., 2022).

Juvenilní hormon se společně s 20-hydroxyekdysonem (20E) podílí na svlékání a metamorfóze hmyzu (Riddiford 2012). Juvenilní hormony udržují larvu v larválním stádiu a brání nástupu metamorfózy larvy v dospělého jedince. Brání expresi určitých genů pro metamorfózu (Hiruma et Riddiford 2010; Riddiford 1978;). Působí ale pouze na buňky, které obsahují JH receptor (Jindra et al., 2015). V posledním larválním stádiu, kdy už je tělo larvy připravené na proměnu, se v těle nenachází žádný titr JH. Pokles titru JH je způsoben zastavením jeho sekrece z *copora allata* a zvýšením titru esterasy juvenilního hormonu v hemolymfě a JH senzitivních tkání (např. oko, mozek, ventrální bránice). Zvýšení titru JH III stimuluje prothorakální žlázy, které sekretují protoracikotropní hormon, jenž pozitivně ovlivňuje syntézu ekdysonu, z něhož dále vzniká svlékací hormon 20E (Riddiford, 2012). Při expozici 20E in vitro na epidermis zadečku *Manduca sexta* byl vyvolán proces zakuklení u larev. Kdežto když byla kromě 20E larva vystavena zároveň i JH, tak k zakuklení nedocházelo (Riddiford, 1978). Dle Minakuchi et al. (2009) vede ztráta Krüppelova homologu (Krh-1) působením RNAi u larev *Tribolium* k předčasné metamorfóze. U larev je přítomna během celého larválního období mRNA Kr-h1. Její hladiny pak klesají v posledním larválním instaru. K jejímu mírnému nárůstu dochází ještě ve stádiu předkukly, těsně předtím než dojde ke svlékání kukly (Minakuchi et al., 2009).

Juvenilní hormon je dále u některého hmyzu s diapauzou zapojen do regulace mateřské diapauzy (Mukai et al., 2022). Diapauza je periodické hormonálně řízené přerušení fyziologického vývoje doprovázené zpomalením metabolismu. K diapauze dochází v důsledku nepříznivých vnějších podmínek. Hmyz je v diapauze do té doby, než dojde k synchronizaci s vnějšími biotickými a abiotickými podmínkami vhodnými k přežití daného organismu. U každého druhu hmyzu s diapauzou k tomu dochází v jiném vývojovém stádiu (Denlinger et al., 2012). Diapauza je řízená hormonálně v reakci na délku fotoperiody a venkovní teplotu. U mateřské diapauzy platí, že při delší fotoperiodě se u matek *Nasonia vitripennis* zvyšuje množství JH III, které je spojené s vyšší expresí o-methyltransferasy (*jhamt*). Potomci vylíhnutí z vajíček nakladených matkou v době, kdy měla vyšší hladiny JH III nevstupují do diapauzy. Oproti tomu potomci matky, kteří se vylíhli v zimním období, kdy měla matka nižší hladiny JH III a nižší expresi *jhamt* vstupují do diapauzy v čtvrtém larválním instaru (Denlinger et al., 2012).

JH také ovlivňuje syntézu vitellogeninu (Vg) v tukovém tělese. Nižší titry JH jsou spojovány s vyšší syntézou Vg, který pozitivně ovlivňuje rozmnožování hmyzu (Corona

et al., 2007; Pinto et al., 2000). Vg je totiž prekurzorem vitellinu, který je důležitým zdrojem živin pro vyvíjející se embryo (Hagedorn et Kunkel, 1979).

## **2.2.4 Dlouhověkost včel**

Interakce mezi JH III a vitellogeninem, mezi kterými platí vzájemná negativní korelace, ovlivňují a regulují fyziologické procesy ve včelstvu jako je dělba práce, reprodukce a dlouhověkost včel (Amdam et al., 2003).

### **2.2.4.1 Letní a zimní generace včel**

V průběhu roku se ve včelstvu vymění dvě generace včel, krátkověká letní generace včel a dlouhověká generace zimních včel (Fukuda et Sekiguchi, 1966). K výměně generací dochází vždy na jaře a na podzim (Fluri et al., 1982).

Včely letní generace se v hnízdě vyskytují od dubna do srpna. Dožívají se zhruba 40 dnů (Fluri et al., 1982). Dělnice mají vyšší hladiny JH III a nižší hladiny vitellogeninu v hemolymfě než zimní generace včel (Dostálková et al., 2021; Fluri et al., 1977). Jejich hlavním úkolem je sběr vody, pylu, nektaru a medovice. Připravují zásoby pro zimní generaci včel, starají se o snůšku a nově vylíhlý plod (Fluri et al., 1982). Oproti zimní generaci mají více vyvinutou buněčnou imunitu, která je chrání před patogeny zvenčí. Hlavní část buněčné imunity představují hemocyty. Humorální imunita je u nich minimálně vyvinutá (Dostálková et al., 2021; Steinman et al., 2015).

S příchodem podzimu, během srpna až září, se ve včelstvu začínají vyskytovat dělnice zimní generace. Tento proces výměny generací včel je řízen několika faktory, mezi které patří např. změna v zásobních živinách, poklesu snůšky a snůškového feromonu, pokles venkovní teploty, zkrácení fotoperiody či změna mikroklima v hnízdě (Knoll et al., 2020). Vlivem sníženého množství dostupné potravy a teploty venku dochází k útlumu letové aktivity létavek (Ribbands, 1952). Jedinci, kteří sháněli potravu na podzim, buď zemřou anebo se z nich stanou vlivem poklesu titru JH III v hemolymfě včely zimní generace. Tyto včely jsou pak zapojeny do péče o včelstvo během následujících měsíců, dokud se neobjeví nová letní generace včel. Zimní generace je pak tvořena těmito včelami a čerstvě vylíhnutými dělnicemi zimní generace včel (Fukuda et Sekiguchi, 1966).

Zimní generace se v hnízdě vyskytuje od listopadu do února. Tyto včely se vyznačují svojí dlouhověkostí, protože se dožívají až 5–6 měsíců. Jejich hlavním úkolem je úspěšně přezimovat, starat se o plody a regulovat teplotu hnízda (Fluri et al., 1982; Fukuda et Sekiguchi, 1966).

Zimní generace se poněkud liší od té letní. Včely mají v hemolymfě nízkou hladinu JH III a vyšší hladinu vitellogeninu, proteinů a lipidů (Dostálková et al., 2021, Fluri et al., 1977; Kunc et al. 2019). Mají zvětšené hltanové žlázy a zvětšené tukové těleso (Knoll et al., 2020). Tukové těleso produkuje vitellogenin, který vykazuje silné antioxidační vlastnosti a včely jsou díky tomu více rezistentní vůči oxidačnímu stresu (Corona et al., 2007). Mají více vyvinutou humorální imunitu, na které se podílí antimikrobiální peptidy (apidaecin, abaecin, defensin-1, hymenoptaecin) a další proteiny, které jsou produkovány tukovým tělesem v přítomnosti bakteriální infekce (Daníhlík et al., 2016). Steinman et al. (2015) zaznamenali u včel zimní generace nakažených virem deformovaných křídel sníženou buněčnou imunitu a zvýšenou expresi genů zapojených do humorální imunity. Dostálková et al., 2021 se zabývala imunitní reakcí 10denních dělnic letní a zimní generace po nákazou usmrcenými bakteriemi *Escherichia coli* a *Paenibacillus larvae*. Imunitní reakce na bakteriální nákazu byla intenzivnější u zimní generace včel, která vyvolala expresi antimikrobiálních genů, snížení exprese genu vitellogeninu a jeho koncentraci v hemolymfě.

Od února se opět začíná ve včelstvu objevovat dělba práce, začíná sběr pylu a nektaru. V březnu až dubnu umírají včely zimní generace a líhnou se včely letní generace. Přeměna na letní generaci je doprovázená zvýšením titru JH III v hemolymfě včel (Fluri et al. 1982).

#### **2.2.4.2 JH III a jeho vliv na věkový polyethismus ve včelstvu**

Věkový polyethismus a s ním spojená dělba práce ve včelstvu je dána fyziologickými změnami titru JH III a vitellogeninu (Amdam et al., 2003; Huang et al., 1991). Nízké hodnoty JH III jsou spojovány s krmičkami a vysoké s létavkami (Robinson et al., 1992). Nejnižší hodnoty JH III mají čerstvě vylíhnuté včely, pak dochází k nárůstu JH III v hemolymfě. U 12 dnů starých krmiček byla naměřena poloviční koncentrace JH III než u 24 dnů starých létavek (Rütz et Lüscher, 1974).

Dle Huang et al. (1991) stojí za nízkými hladinami JH III u krmiček rozdíl rychlosti syntézy JH III v *corpora allata*. Pomocí radiochemického testu dokázali, že rychlost

biosyntézy byla u krmiček nižší a s postupem věku se snižovala. CA obsahovala methylfarnesoát, což je prekurzor JH III, a do inkubačního média uvolňovala JH III. Závěrem tedy bylo, že rozdíly v titru JH III mezi krmičkami a létavkami byly dány rychlostí syntézy JH III, a ne rychlostí uvolňování či degradace JH III v hemolymfě. Na druhou stranu Mackert et al. (2008) přišel s tvrzením, že rozdílné hodnoty mezi krmičkami a létavkami řídí JHE, která se podílí na odbourávání JH III v hemolymfě. Přeměna z krmičky na létavku a dělba práce je regulována dle potřeb včelstva, které jsou ovlivněné dostupností potravy, stavem včelstva a množstvím plodu. Navzdory věku se tak může z létavky stát opět krmička nebo z krmičky předčasná létavka (Robinson et Paige, 1991; Robinson et al., 1992). Reverzní chování může např. nastat, když je ve včelstvu nedostatek krmiček (Robinson et al., 1992). Nejdříve dochází k reverzi nejmladších dostupných létavek, které jsou na změny titru JH III více senzitivní a snáze se vrátí k roli krmičky (Robinson et Paige, 1991). Naopak u krmiček, které byly ošetřeny roztokem JH III či jeho napodobeninami, došlo ke změně chování. Zvýšení titru JH III vedlo k tomu, že se jim přestaly vyvíjet hltanové žlázy a začaly předčasně sbírat pyl, hlídat na česně, zvýšila se jejich letová aktivita a také dříve umíraly (Jaycox et al., 1974; Jaycox, 1976).

Lourenço et al. (2019) se ve své práci věnovaly rozdílné imunitní reakci krmiček a létavek po nákaze bakteriální infekcí *Serratia marcescens*. Mladší včely, které měly méně JH III, vyvinuly po nákaze silnější imunitní reakci. Aktivace imunitního systému vedla ke snížení exprese genů *vg*, *jhe* a *ilp* u létavek, které měly vyšší hladiny JH III. Zároveň se po nákaze dožily kratšího věku než krmičky.

### 2.2.4.3 Vitellogenin

Vitellogenin (Vg) je prekurzor vitellinu, což je hlavní protein žloutkového proteinu, představující nejdůležitější zdroj živin pro vyvíjející se embryo (Hagedorn et Kunkel, 1979). Vg ovlivňuje rozmnožování hmyzu a dlouhověkost včel (Corona et al., 2007). Krom toho také transportuje lipidy a sacharidy v hemolymfě a má silné antioxidační účinky (Fruttero et al., 2017; Corona et al., 2007). Jedná se o 180 kDa monomer (Wheeler et Kawooya, 1990). Jeho syntéza v tukovém tělese je řízena titry JH III, přičemž zde platí negativní korelace mezi JH III a Vg, čili vyšší titry JH III snižují syntézu Vg a naopak (Pinto et al., 2000).

Vyšší hladiny Vg jsou spojovány s dlouhověkostí zimních včel a matek. Matky jsou

díky němu více odolné oxidačnímu stresu, jsou plodné a dožívají se 3–5 let. Vg je také syntetizován tukovým tělesem dělnic, i přestože jsou neplodné a mají zakrnělé oocyty (Amdam et al., 2003; Corona et al., 2007). Expres vitellogeninu byla detekována ve vaječnicích královen, ale ne ve vaječniku dělnic (Karina et al., 2005). Krmičky dosahují nejvyšších hladin Vg kolem 12 dne, pak dochází k jeho poklesu (Rütz et Lüsher, 1974). Trubci Vg v dospělosti nesyntetizují, pouze v ranných vývojových stádiích a v malém množství (Kunc et al., 2019).

## 2.3 Ekdysteroidy

Ekdysteroidy jsou steroidní hormony odvozené od cholesterolu. Jedná se o velkou skupinu polyhydroxylovaných steroidů čítající více jak 500 sterolových derivátů. Mezi společné znaky ekdysteroidů patří uhlíkový sterolový skelet, cis (5 $\beta$ ) přechod A/B kruhu, 7-en-6-on chromofor a 14 $\alpha$ -OH skupina. Podle výskytu v organismech se dělí na zooekdysteroidy, fytoekdysteroidy a mykoekdysteroidy. Zooekdysteroidy se vyskytují u členovců, u nichž ovlivňují a regulují svlékání, vývoj a rozmnožování. Rostlinné fytoekdysteroidy představují endokrinní disruptory chránící rostliny před bezoobratlými škůdci (Lafont et al., 2021).

Poprvé byly ekdysteroidy izolovány v roce 1954 Butenandtem a Karlsonem z kukel *Bombyx mori*. Jednalo se o první izolovaný hmyzí hormon v čisté formě (Butenant et Karlson, 1954). Ekdysteroidy lze stanovit a kvantifikovat pomocí kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií, imunochemicky metodou ELISA nebo pomocí radioimunoanalýzy (RIA) (Lafont, 2012). Yamazaki et al. (2011) detekovali ekdysteroidy v hemolymfě, mozku, *corpora allata*, vaječnicích a včelích dělnic pomocí kombinace vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a RIA. Extrakce ekdysteroidů pro RIA byla provedena hexanem a jako protilátka posloužilo králíčí anti - 20E sérum. V kombinaci s HPLC byla extrakce provedena směsí hexan – methanol. Chromatografická separace proběhala na C<sub>18</sub> koloně a sesbírané frakce byly podrobeny RIA. Bollenbacher et al. (1975) stanovali ekdyson v larvách u *Manduca sexta* pomocí RIA. Robinson et al. (1991) použili kombinaci RIA a HPLC k detekci titru ekdysteroidů v hemolymfě včel.

### 2.3.1 Biosyntéza

Ekdysteroidy jsou syntetizovány u hmyzu od embryonálního vývoje až do dospělosti. Ve stádiu larvy a kukly jsou ekdysteroidy primárně syntetizovány v prothorakální žláze (PG) (Bollenbacher et al., 1975).

PG je u dvoukřídlého hmyzu tvořena bilaterálním shlukem polymorfonukleárních buněk nacházejících se v prothoraxu. Syntéza ekdysteroidů prothorakální žlázou je řízena prothoracikotropním hormonem (PTTH). PTTH je syntetizován neurosekrečními buňkami mozku, z nichž je transportován axony do *corpora allata* (CA). Z CA se uvolňuje do hemolymfy, kterou je transportován do buněk prothorakální žlázy,

kde skrze signální dráhu, zahrnující příliv vápenatých iontů a aktivaci adenylátcyklasy, fosforyluje ribosomální protein S6 aktivující tvorbu ekdysteroidů (Gilbert et al., 1997).

Syntéza ekdysteroidů je pravděpodobně regulována zpětnovazebnou regulací ekdysteroidových receptorů v PG vazbou ekdysonu a 20-hydroxyekdysonu (Beydout et Lafont, 1983). Na regulaci se také podílí prothoracikostatický peptid, který je schopný inhibovat syntézu (Liu et al., 2004).

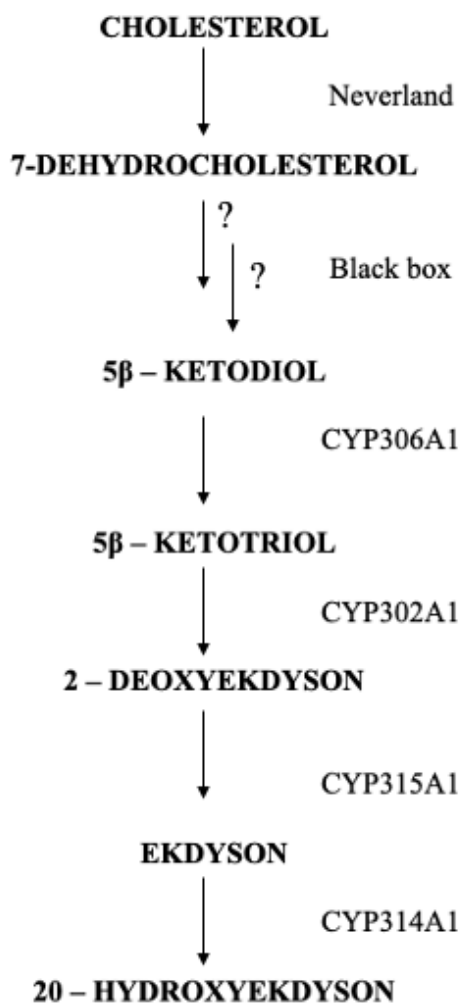
Prekurzorem ekdysteroidových hormonů je cholesterol. Většina hmyzu však není schopna endogenní syntézy cholesterolu, protože jim chybí skvalensyntasa a skvalencyklasa (Kurzachalia et Ward, 2003). Proto musí přijímat cholesterol stravou ve formě fytosterolů, které se ve střevech přeměňují na cholesterol, který jsou už pak schopni využít (Yamazaki et al. 2011).

Po přeměně fytosterolu na cholesterol je cholesterol působením enzymu Neverland (EC: 1.14.19.21) přeměněn na 7,8 – dehydrocholesterol. Poté následuje série neznámého počtu enzymatických reakcí, spadajících do tzv. Black box, jejichž výsledkem je vznik 5 $\beta$ – ketodiolu. Z 5 $\beta$  – ketodiolu dále vzniká 5 $\beta$  – ketotriol, 2-deoxyekdyson a pak ekdyson. Tyto reakce jsou katalyzovány enzymy P450 (Obr. 3) (Lafont et al. 2021; Niwa et Niwa, 2014; Yamazaki et al. 2011).

Ekdyson je prohormon, který opouští prothorakální žlázy a je transportován hemolymfou do periferních tkání, kterými jsou např. tukové těleso, epidermis nebo mozek. V cílových tkáních se ekdyson mění na 20-hydroxyekdyson (20E), který na rozdíl od ekdysonu je hormonálně aktivní (Lafont et al. 2021; Niwa et Niwa, 2014; Yamazaki et al. 2011).

Prothorakální žlázy obvykle degenerují před časným stádiem dospělosti a u dospělých jedinců se tedy nenachází (Lafont et al. 2012). V dospělosti jsou ekdysteroidy syntetizovány u samic hmyzu vaječníky (Hagedorn et al. 1975). U samců jsou pak v menší míře syntetizovány varlaty (Gilliot et Ismail, 1995).





Obrázek 3 Biosyntetická dráha 20E v prothorakálních žlázách. Upraveno podle Lafont et al., 2021; Niwa et Niwa, 2014; Yamazaki et al. 2011).

### 2.3.2 Degradace ekdysteroidů

Katabolismus degradace zahrnuje tři typy chemických reakcí – konjugaci, oxidaci a izomeraci (Gilbert et al., 2003).

Nejčastější reakcí je konjugace, při které vznikají acylkonjugáty, fosfátglykosidové nebo sulfátové konjugáty. Také mohou vznikat fosfátové nebo acylesterové konjugáty s mastnými kyselinami. Konjugáty s mastnými kyselinami mohou být následně vázány na žlutkový protein a v průběhu embryogeneze se opět uvolňovat do hemolymfy (Klowden, 2008). Acetylací a následnou hydrolyzou vzniká směs ekdysondiacetátů, přičemž většinu směsi tvoří  $\beta$ -ekdyson-2,3-diacetát, který je vylučován Malpigickými trubicemi (Russel et Price, 1977).

K isomeraci dochází ve středním střevě hmyzu působením ekdysonhydrogenasové isomerasy. Epimerací ekdysonu vzniká 3 $\alpha$ -ekdyson (Nigg et al., 1974).

### 2.3.3 Receptor pro ekdysteroidní hormony

Ekdysteroidový receptor je jaderný receptor, který reaguje transkripční odezvou na steroidní a lipofilní molekuly. Jedná se o heterodimer tvořený ekdysonovým receptorem (EcR) a ultraspiracle proteinem (USP). Tento receptorový komplex se po navázání ekdysteroidů váže na specifická místa promotoru DNA a reguluje genovou expresi (Henrich et al., 200; Koelle et al., 1991). EcR se nemusí vždy vázat jen na USP, předpokládá se, že existují i další proteiny, se kterými může vytvářet heterodimery (Henrich, 2012). USP je strukturálně podobný retinoidnímu receptoru X (RXR) u obratlovců, jež je schopen dimerizovat s různými jadernými receptory (Oro et al. 1992).

Ekdysteroidový receptor se skládá z několika domén. A/B doména se nachází na N–konci. Jedná se o transaktivační doménu nezávislou na ligandu (AF1). DBD doména obsahuje sekvenci cystein-cystein zinkový prst. Úkolem této domény je rozpoznávat palindromickou invertovanou repetitivní sekvenci, která je oddělená jedním nukleotidem (IR1).

Pantová D doména slouží k heterodimerizaci EcR s USP. Doména E je zodpovědná za interakci s ligandem, který je příbuzný receptoru. Je složená z dvanácti alfa helixů, které vytvářejí kapsu, do které se může vázat ligand. Některé druhy hmyzu ještě obsahují doménu F, která ale neplní žádnou důležitou funkci (Henrich, 2012).

### 2.3.4 20– hydroxyekdyson a účinky ekdysteroidů

Ekdyson byl poprvé izolován a popsán Huberem a Hoppem v roce 1965 (Huber et Hoppe 1965). Jedná se o prohormon 20E, na který je přeměněn v cílových tkáních, mezi něž se řadí epidermis, mozek a tukové těleso (Yamazaki et al., 2011). Ekdyson vstupuje do buněk skrze membránový přenašeč ecdysone importer (EcI) (Okamoto et al., 2018). V cytoplazmě buněk je přeměněn na aktivní formu 20E, který následně reaguje s jaderným receptorem a iniciuje transkripční aktivitu (Gilbert et al., 2002).

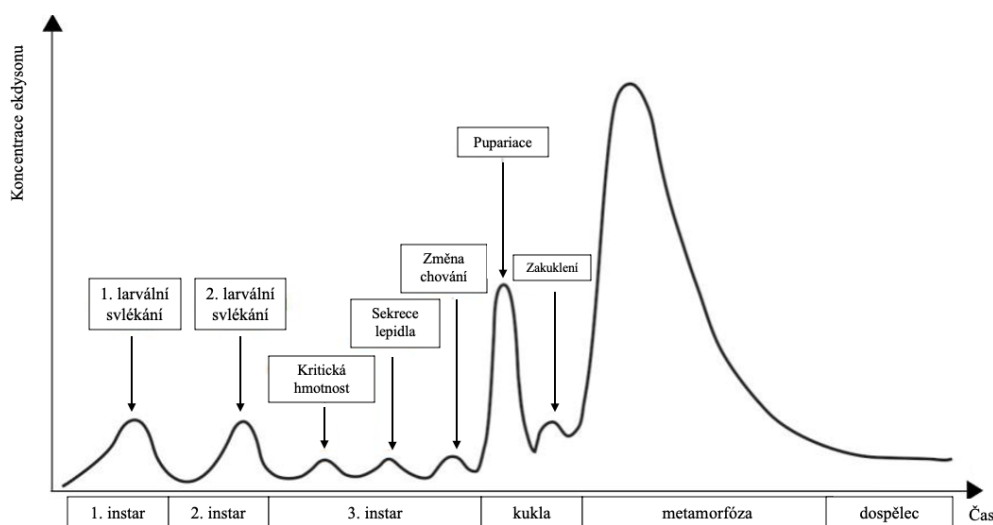
20E hraje klíčovou roli při svlékání a metamorfóze hmyzu. Proces svlékání zahrnuje apolýzu staré kutikuly, sekreci nové kutikuly a ekdýzu staré kutikuly. Tento proces je hormonálně řízen ekdysonem a juvenilním hormonem. Hmyz během svého vývoje

celkem třikrát vymění kutikulu (Gilbert et al. 1980). Během metamorfózy dochází ke změně celého larválního těla v dospělého jedince. Vzniká nová epidermis, přestavuje se nervová soustava, staré tkáně degenerují a zanikají, zároveň ale dochází ke vzniku a diferenciaci nových buněk. Krátce před zahájením metamorfózy všechny tkáně exprimují vysoké hladiny EcR (Riddiford et Truman, 1993).

V průběhu prvního a druhého instaru, kdy dochází ke svlékání hmyzu, se navyšuje hladina titru ekdysonu v hemolymfě (Gilbert et al. 1980). Během třetího larválního instaru dochází k výraznému zvýšení titru ekdysteroidů a následné metamorfóze kukly v dospělého jedince. Během třetího instaru (Obr. 4) se celkem 3× zvyšuje hladina ekdysteroidů. První puls nastává při dosažení kritické hmotnosti hmyzu. Druhý puls iniciuje produkci látky sloužící k přilepení pouzdra kukly. Třetí puls vede k tomu, že hmyz přestane přijímat potravu a čtvrtý pak k zakuklení a metamorfóze, při níž se také výrazně navyšuje titr ekdysonu v hemolymfě (Warren et al. 2006).

Ekdysteroidy hrají dále roli v rozmnožování hmyzu. Jsou důležité pro vývoj a zrání oocytů. Folikulární epitel vaječníků dospělých samic syntetizuje ekdysteroidy, které po přeměně na 20E regulují syntézu choriových proteinů. (Hagedorn et al., 1975; Lagueux et al. 1977). U samců hmyzu jsou zase syntetizovány varlaty a ovlivňují vznik spermatoforu a spermatogenezi (Gilliot et Ismail, 1995).

U některého hmyzu kontrolují ekdysteroidy vitellogenezi. Jsou zodpovědné za indukci genové exprese žlutkového proteinu a přesun vitellogeninu z tukového tělesa do zrajících oocytů (Bownes, 1994).



Obrázek 4 Nárůst hladiny titru ekdysonu v hemolymfě v larválním období. Převzato z Kannangara et al., 2021.

## 2.4 Neurohormony

Neurohormony jsou produkovány neurosekrečními buňkami mozku. Neurosekreční buňky jsou hybridní buňky neuronů a endokrinních žláz. Jedná se o specializované neurony produkující hormony v neurohemálních orgánech jako je například *corpora cardiaca*. Mezi neurohormony řadíme například protoracikotropní hormon, allotropiny, allostatiny, adipokinetické hormony, diuretický hormon, diapauzní hormon, proctolin, oktopamin, tyramin (Klowden, 2008).

### 2.4.1 Protoracikotropní hormon

Protoracikotropní hormon (PTTH) je peptidový hormon produkováný neurosekrečními buňkami mozku, z nichž je transportován axony do *corpus cardiacum* nebo *corpus allatum* (Klowden, 2008). Jedná se o 14–29 kDa prekurzor peptidu skládající se z 224 aminokyselin, který je následně štěpen na aktivní peptid o 109 aminokyselinách tvořících dva řetězce, které jsou navzájem spojené disulfidovými vazbami (Nagata et al., 2005). Hormon je transportován hemolymfou do prothorakálních žláz, kde aktivuje syntézu ekdysteroidů (Gilbert et al., 1997).

První zmínky o vztahu mozku s prothorakálními žlázami popsal ve své práci Wigglesworth (1940), podle něhož jsou velké neurosekreční buňky *Rhodius prolixus* zdrojem aktivity PTTH. Dle Fukuda (1940) žlázy prothoraxu produkují hormon nezbytný k zakuklení. Williams (1947) přišel k závěru, že mozek a PTTH jsou nutné k ukončení diapauzy u hmyzu.

Syntéza PTTH je řízena cholinergními neurony, jako je například acetylcholin (Agui, 1989), a melatoninem (Richter et al., 2000). Melatonin zvyšuje uvolňování PTTH v závislosti na cirkadiánním rytmu hmyzu, který má všeobecně vliv na vývoj hmyzu (Richter et al., 2000; Truman, 1972). Oproti tomu prothoracikostatický hormon inhibuje syntézu PTTH a tím i ekdysteroidogenezi.

Receptor pro PTTH je tyrosinkinásový. Po navázání PTTH na receptor dochází ke zvýšení hladin intracelulárního  $\text{Ca}^{2+}$  a aktivaci adenylylácyklasy. Výsledkem celé kaskády reakcí je fosforylace ribosomálního proteinu S6 aktivující tvorbu ekdysteroidů (Gilbert et al., 1997; Smith et Rybczynski, 2012).

## 2.4.2 Allotropiny a allostatiny

Allotropiny a allostatiny jsou peptidy regulující syntézu juvenilního hormonu v *corpora allata* (CA) (Gilbert et al., 2000). Allotropiny jsou peptidy složené z 13 aminokyselin stimulující sekreci JH z CA (Kataoka et al. 1989).

Oproti tomu allostatiny působí jako reversibilní inhibitory sekrece JH z CA (Woodhead et al., 1989). Donley et al. (1993) izolovali z mozku *Diploptera punctata* RNA, která byla následně přepsána do cDNA kódující prekurzorový polypeptid allostatinů. Na základě peptidové sekvence potvrdili strukturu nejméně třinácti druhů allostatinů (Donley et al., 1993). Jednotlivé typy allostatinů se liší účinností inhibice. Na účinnost inhibice má kromě typu allostatinu také vliv, o jaký hmyz se jedná a v jakém vývojovém a fyziologickém stádiu se jednotlivec právě nachází (Stay et al., 1995). Allostatiny se také mohou nacházet v hemolymfě a v buňkách středního střeva (Stay et al., 1995). Schopnost allostatinů inhibovat syntézu JH z CA závisí na jejich koncentraci a citlivosti, která je dána počtem receptorů, CA na ně reagovat (Stay et al., 1996). Allostatiny lze detekovat např. pomocí HPLC (Woodhead et al. 1989).

## 2.4.3 Adipokinetický hormon

Adipokinetické hormony (AKH) jsou u hmyzu syntetizovány a uvolňovány z neurosekrečních buněk *corpus cardiacum* (CC) (Diederer et al., 2002). Jedná se o skupinu peptidových hormonů patřících do RPCH/AKH rodiny čítající více jak 30 členů (Taub-Montemayor et al., 1997). AKH lze detekovat pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (Orchard et al. 1987).

Adipokinetické hormony se podílejí na mobilizaci sacharidů a lipidů z tukového tělesa za účelem zisku energie. Děje se tomu při energeticky náročných činnostech jako je např. pohyb či let. AKH je uvolněn z CC do hemolymfy, kterou je transportován do tukového tělesa, kde se váže na buněčný AKH receptor spřažený s G-proteinem. Vazba na receptor spouští kaskádu reakcí zahrnující aktivaci adenylátcyklasy, aktivaci druhého posla a uvolnění vápenatých kationtů, které vedou k aktivaci proteinkinasy. Výsledkem je štěpení triacylglycerolu na diacylglycerol (DAG) pomocí lipasy. DAG je transportován lipophoriny do svalů, kde se štěpí na glycerol a mastné kyseliny, které jsou dále odbourávány za vzniku ATP (Gäde & Auerswald, 2003). AKH se dále se podílejí

např. na udržení hemostázy cukrů v hemolymfě, stimulaci srdeční činnosti, aktivaci glykogenfosforylasy, inhibici syntézy lipidů a proteinů (Kodrik, 2008).

#### **2.4.4 Další neurohormony**

Mezi další neurohormony řadíme např. diuretický hormon, diapauzní hormon, proctolin, oktopamin, tyramin a další. Diapauzní hormon je důležitý u hmyzu s diapauzou. Během dozrávání vajíček je uvolňován z jícnového ganglionu. Působí na vaječníky, které produkují vajíčka, z nichž se vylíhnou potomci s mateřskou diapauzou (Tsuchiya et al., 2021). Proctolin stimuluje svalové kontrakce střeva, srdce a vejcovodů. Dále působí jako neuromodulátor pro kosterní svaly (Brown, 1977; Cook et Meola, 1978; Miller, 1979). Diuretický hormon stimuluje resorpci vody z Malpigických trubic, diurézu a tvorbu moči. Oproti tomu antidiuretické hormony, mezi které se např. řadí neuroparsin, stimuluji zpětnou resorpci vody ze střeva do hemolymfy (Fournier et al, 1992; Phillips, 1981). Oktopamin je biogenní amin působící jako neurotransmitér a neuromodulátor u hmyzu. Jedná se o analog norepinefrinu. Oktopamin se podílí na regulaci činnosti endokrinních žláz. Dále v cílových tkáních aktivuje mobilizaci sacharidů a lipidů, díky čemuž je hmyz poté schopen využít velké množství uvolněné energie při aktivitě vyžadující zvýšený výdej energie (Farooqui, 2012; Ubuka 2021). Tyramin je prekurzorem oktopaminu. Jedná se taktéž o neurotransmitér a neuromodulátor hmyzu, který působí jako antagonist a oktopaminu (Lange, 2009).

## **2.5 Vývoj metody pro detekci a kvantifikaci juvenilního hormonu III**

### **2.5.1 Vývoj metody**

Před samotným vývojem nové bioanalytické metody je vhodné znát fyzikálně-chemické vlastnosti analytu, jeho metabolismus a možné metody pro jeho stanovení (Whitmire et al., 2011). Analyt je látka, kterou stanovujeme pomocí analytické metody ve vzorku. Ostatní látky ve vzorku jsou označovány jako matrice (Záruba et al., 2016). V průběhu vývoje metody je třeba optimalizovat vhodné použití chemických látek a rozpouštědel, laboratorních technik, podmínek pro provádění analýzy, ředění látek, vhodné skladování látek a roztoků (Whitmire et al., 2011). Dále je třeba zavést referenční vzorky a vzorky pro kontrolu kvality. Vyvinutá metoda by se měla následně validovat a verifikovat (Tiwari & Tiwari, 2010).

### **2.5.2 Validace metody**

Validace by měla prokázat vhodnost a přijatelnost metody pro měření daného analytu. Výsledkem validace metody je písemný popis analytické metody a postup validace. Validace může být úplná, částečná nebo křížová. (Tiwari & Tiwari, 2010). Validace bioanalytických metod by měla být provedena dle postupu FDA (US Food and Drug Administration for Industry) nebo EMA (European Medicine Agency). V průběhu validace se stanovují následující parametry: selektivita, specifita, kalibrační křivka, rozsah měření – dolní a horní mez kvantifikace a detekce, přesnost a preciznost, přenos, výtěžnost, matricové efekty, stabilita a reprodukovatelnost.

#### **2.5.2.1 Selektivita**

Pojmem selektivita se označuje schopnost analytické metody odlišit analyt od nepříbuzných sloučenin obsažených v matrici na základě fyzikálně–chemických vlastností (Jenkins et al., 2015; Záruba et al., 2016). Jedná se o rozsah, ve kterém může být analyt stanoven, aniž by docházelo k matricovým efektům jiných látek obsažených ve vzorku (Záruba et al., 2016).

Selektivita může být skupinová, kdy pomocí dané metody jsme schopni určit pouze nějakou skupinu látek (např. lipidy), anebo specifická, kdy jsme schopni stanovit analyt

ve směsi různých látek (Záruba et al., 2016). Selektivita společně se specifitou dávají představu o tom, jak je metoda spolehlivá (Taverniers et al., 2012).

Selektivita se vyhodnocuje analýzou alikvotů minimálně 6 vzorků slepé matrice. Přičemž se hodnotí neoobohacený alikvot, alikvot obohacený o IS a alikvot obohacený stanovovaný analytem na LLOQ a IS. Odezva signálu složek v pozadí v neoobohacených slepých vzorcích matrice by neměla být vyšší než 20 % LLOQ pro analyt a 5 % pro IS (Jenkins et al., 2015).

### **2.5.2.2 Specifita**

Specifita nám zajišťuje, že stanovujeme pomocí dané metody pouze požadovaný analyt (Racek et al., 2021). Přesněji se jedná o schopnost metody přesně určit a specifikovat analyt od ostatních složek ve vzorku, které jsou příbuzné stanovovanému analytu (Jenkins et al., 2015). Zpravidla platí, že když je metoda selektivní na 100 %, pak je i specifická (Taverniers et al., 2012).

### **2.5.2.3 Výtěžnost**

Ke vzorku se přidá známé množství standardu stanovovaného analytu. Vzorek se změří a zkoumá se, kolik procent ze známého množství analytu se pomocí dané metody stanovilo. Když je výtěžnost menší než 100 % dochází v průběhu analýzy ke ztrátám analytu. Metoda tedy není schopná detekovat všechny molekuly analytu obsažené ve vzorku. Oproti tomu, když je výtěžnost vyšší než 100 %, tak dochází ke stanovení i jiných interferujících molekul (Racek et al., 2021). Měří se nejméně šest vzorků s nízkou, střední a vysokou koncentrací analytu. Porovnávají se hodnoty vzorků s přídavkem analytu před a po extrakci. Výtěžnost analytu a IS by měla být na všech úrovních koncentrace stejná (Whitmire et al., 2011).

### **2.5.2.4 Kalibrační křivka a rozsah**

Kalibrační křivka popisuje vztah mezi signálem analytu a množstvím (koncentrací) analytu ve vzorku. Je vhodné pracovat v lineárním rozsahu křivky a nejméně s šesti kalibračními vzorky. Pracovní rozsah křivky by měl obsahovat limit detekce (LOD), limit kvantifikace (LLOQ), horní limit kvantifikace (ULOQ) a limit blanku (LB) (Racek et al., 2021; Záruba et al., 2016).



LOD je nejmenší množství analytu, které lze pomocí dané metody detekovat a prokazatelně odlišit signál analytu od signálu pozadí, které se zjišťuje měřením blanku bez přídavku analytu. Limit blanku (LOB) je vyjádřen jako průměr z naměřených hodnot blanku + 1,645 směrodatné odchylky. LOD je pak trojnásobkem výběrové směrodatné odchylku průměrných hodnot signálu naměřených pro blanky (Racek et al., 2021; Záruba et al., 2016).

LLOQ je nejmenší množství (koncentrace) analytu, které lze se spolehlivou precizností a přesností kvantifikovat ve vzorku. Většinou se jedná o desetinásobek výběrové směrodatné odchylku průměrných hodnot signálu naměřených pro blanky (Záruba et al., 2016). LOQ charakterizuje citlivost metody (Whitmire et al., 2011).

Pro kvantifikaci analytu ze vzorku lze použít metodu vnitřního standardu. Vnitřní standard (IS) je látka, která má podobné fyzikálně–chemické vlastnosti jako stanovovaný analyt, ale nenachází se v matrici a nemá interferující vliv na stanovovaný analyt. (Záruba et al., 2016). U JH III to může být např. methopren, JH III značený deuteriem nebo precocen II (Ramirez et al., 2016; Zharigetou et al., 2007). Ke každému vzorku je přidáno známé množství IS. Na grafu pak osa y reprezentuje poměr signálu (standardu) analytu a vnitřního standardu a osa x je poměrem obsahu analytu a IS. Směrnice kalibrační závislosti reprezentuje citlivost metody (Záruba et al., 2016).

### **2.5.2.5 Přenos**

Přenos se měří změřením dvou blanků po vzorku obohaceném o ULOQ standardu analytu. Přenos by měl být menší než 20 % signálu LLOQ analytu a méně než 5 % pro IS (Whitmire et al., 2011). K přenosu může docházet například v důsledku adsorpce analytu k různým částím přístroje, použití nevhodné mobilní fáze nebo kolony či špatným ředěním vzorku (Jenkins et al., 2015; Whitmire et al., 2011). V průběhu vývoje metody by se měl vyřešit a minimalizovat přenos (Whitmire et al., 2011).

### **2.5.2.6 Matricové efekty**

Látky obsažené v matrici mohou mít interferenční vliv na hodnotu měřeného signálu analytu (Záruba et al., 2016). U hmotnostní spektrometrie se jedná o potenciální potlačení nebo zesílení signálu MS. Děje se to často při ionizaci elektrosprejem. K matricovým efektům dochází v menší či větší míře v každém vzorku (Jenkins et al., 2015).

Vliv maticových efektů se vyhodnocuje analýzou minimálně šesti vzorků s přídatkem IS. Hodnotí se vzorky s nízkou a vyšší koncentrací analytu. Výsledný procentuální koeficient variace by měl být menší než 20 % vzorku (Jenkins et al., 2015).

### **2.5.2.7 Přesnost a preciznost**

Přesnost vyjadřuje těsnost shody mezi výsledkem zkoušky a skutečnou hodnotou měřené veličiny. Je vyjádřena vychýlením a ověřuje se analýzou referenčních materiálů a mezilaboratorními testy (Záruba et al., 2016). Přesnost by se měla měřit minimálně v pěti replikátech vzorku se známým množstvím přidaného analytu na každé koncentrační úrovni. Koncentrační úrovně zahrnují přídavek analytu na těchto hladinách: LLOQ, trojnásobek LLOQ (nízká koncentrace), vzorek o koncentraci v 50 % kalibračního rozsahu (střední koncentrace) a vzorek o koncentraci 75 % ULOQ (vysoká koncentrace). Přesnost by pak měla být  $100 \pm 15$  % pro nízké, střední a vysoké koncentrace vzorku a  $100 \pm 20$  % pro vzorky koncentrace na hladině LLOQ (Whitmire et al., 2011). Dle ISO 5725-1:1994 přesnost zahrnuje pravdivost a preciznost metody. Pravdivost popisuje shodu mezi měřením analytu a skutečnou hodnotou měřeného analytu, která byla získána měřením referenční metodou. Nepravdivost (bias) je obvykle způsobena nějakou systematickou chybou (Racek et al., 2021).

Preciznost je těsnost shody mezi nezávislými výsledky zkoušky získanými za předem stanovených podmínek a je ovlivněna náhodnými chybami. (Záruba et al., 2016). Vyjadřuje, jak daná metoda je schopná při opakovaném měření se stejnou koncentrací analytu, poskytovat stejné výsledky (Racek et al., 2016). Preciznost může být vyjádřena pomocí směrodatné odchylky (RSD), rozpětím, opakovatelností nebo reprodukovatelností (Záruba et al., 2016). Preciznost by měla být 15 % RSD pro nízké, střední a vysoké koncentrace vzorku a 20 % RSD pro vzorky koncentrace na hladině LLOQ (Whitmire et al., 2011). Při nedostatečné preciznosti dochází k náhodným chybám a při měření téhož vzorku dostáváme různé hodnoty (Racek et al., 2021)

### **2.5.2.8 Stabilita**

V průběhu skladování může docházet k degradaci nebo k chemickým změnám vzorku (Jenkins et al., 2015). Obecně by se mělo zabránit vystavení koncentrovaných proteinových roztoků více několikanásobnému procesu zmrazení a rozmrazení,

aby se zabránilo degradaci vzorků. Zásobní roztoky by se měly alikvotovat v malých lahvičkách na jedno použití (Jenkins et al., 2015). Měla by se zkoumat stabilita analytu v matrici, stabilita při opakovaném rozmražení a zmražení, stabilita analytu v zásobních a pracovních roztocích za podmínek skladování a stabilita analytu ve zpracovaném vzorku za podmínek analýzy (Dadgar & Burnett, 1995).

### **2.5.2.9 Reprodukovatelnost**

Reprodukovatelnost je dána několikanásobným opakováním analýzy stejného vzorku stejnou metodou v jiné laboratoři, přístrojích a pracovnících, kteří analýzu provádějí. (Záruba et al., 2016). Dále se měří reprodukovatelnost při opakované reinjekci. Jedná se o opakovaný nástřik kalibračních standardů a vzorků pro přípravu kalibrační křivky, které byly nějakou dobu skladovány. Porovnávají se výsledky z prvního měření před skladováním a pak z měření po určité době, kdy byly vzorky uskladněny (Whitmire et al., 2011).

### **2.5.3 Metoda HPLC/MS pro detekci a kvantifikaci juvenilního hormonu III**

Juvenilní hormony lze detekovat a kvantifikovat pomocí kapalinové chromatografie, plynové chromatografie, hmotností spektrometrie, radioimunoanalýzy (RIA) nebo imunochemicky metodou ELISA. Dále lze pomocí RT-qPCR stanovit expresi enzymů zapojených do metabolismu juvenilního hormonu.

Metoda UHPLC-ESI-QTOF využívá k analýze spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií. V průběhu chromatografie se látky separují na základě rozdílné afinity ke stacionární a mobilní fázi. Hmotnostní spektrometrie je založená na separaci látek dle rozdílných hodnot  $m/z$ . K ionizaci elektrosprejem (ESI) dochází v iontovém zdroji přístroje. Ionizace je založena na vzniku elektrického pole, které je produkováno sprejem nabitých částic, které přenáší svůj náboj na kapky eluentu. Působením inertního plynu dochází k odpaření rozpouštědla. V důsledku zmenšování kapek nastává coulombovská exploze a z neutrální molekuly vznikají nabité ionty. Nabité ionty pak putují do hmotnostního analyzátru, kde jsou separovány na základě rozdílných hodnot  $m/z$ . QTOF analyzátor je založen na tandemovém spojení kvadrupólu s analyzátozem doby letu. (Záruba, 2011).

Juvenilní hormon se nejčastěji stanovuje z odebrané hemolymfy hmyzu. Pomocí metody LC/MS ho z hemolymfy stanovovali Chen et al. (2007), Westerlund et Hoffman (2004), Ares et al. (2012) a Ramirez et al. (2020). Juvenilní hormon lze dále stanovit z celých larev včel (Zhou et al., 2011) nebo z *corpora allata* (Mauchamp et al., 1984).

Chen et al. (2007) stanovovali JH III z hemolymfy *Melanoplus sanguinipes* a *Acyrtosiphon pisum* metodou RIA a HPLC-ESI-MS/MS. K extrakci JH III z hemolymfy použili dvě extrakční činidla – hexan a směs isooktan-methanol. Jako vnitřní standard pro kvantifikaci JH III byl použit methopren a precocen II. Analýza proběhla na C<sub>18</sub> koloně s reverzní fází. Mobilní fáze A byla tvořena vodou a mobilní fáze B methanolem. Pomocí LC/MS metody se podařilo získat MS spektrum pro JH III, kde byly zastoupeny typické píky o hodnotách m/z 289, 267, 249, 235, 217 a 189. Dále se podařilo získat MS spektrum pro methopren, kde byly zjištěny tyto píky o hodnotách m/z 191, 219, 237, 279 a 333. Byl stanoven limit detekce pro LC-MS/MS na  $8,25 \pm 1,44$  pg.

Westerlund et Hoffman (2004) detekovali JH III v hemolymfě *Gryllus bimaculatus*, *Spodoptera frugiperda*, *Acyrtosiphon pisum*, *Mymicaria eumenoudis* pomocí LC/MS. Chromatografická separace byla provedena na C<sub>18</sub> ReProSil-Pur ODS-3 koloně. Mobilní fáze byla tvořena vodou a methanolem. JH byl extrahován z hemolymfy směsí isooktan-methanol v poměru 1:1. Jako vnitřní standard byl použit methopren. V MS spektru byl nejvíce zastoupen adukt JH II se sodíkem (m/z 189). Limit detekce a kvantifikace byl 6 a 20 pg pro JH a 8 a 25 pg pro JH dioly.

Ares et al. (2012) optimalizovali a validovali metodu LC-ESI-MS/MS pro detekci a kvantifikaci JH III z hemolymfy *Apis mellifera*. Metodu následně použili pro kvantifikaci JH III u včel po nákaze *Nosema Apis*. Chromatografie byla provedena na koloně Synergi Hydro-RP. Mobilní fáze byla tvořena mravenčanem amonným a methanolem. Na MS spektrech byl pro JH III detekován pík o m/z 267 a 235. Pro methopren byly detekovány píky o m/z 279 a 237. JH III se extrahoval z hemolymfy směsí isooktan-methanol. Byl stanoven limit detekce a kvantifikace na 6 pg/μl (LOD) a 15 pg·μl<sup>-1</sup> (LOQ). Nejvyšší hodnoty JH III byly zaznamenány u včel po nákaze kmenem *Nosema ceranae* ze Španělska.

Ramirez et al. (2020) optimalizovali metodu HPLC-ESI-MS/MS pro detekci JH I, JH II, JH III, JH III bisepoxidu (JHB3) a JH III vynechaného bisepoxidu (JHSB3) v jediném běhu LC. Chromatografická analýza proběhla na Xbridge BEH Phenyl koloně. Mobilní fáze A byla tvořena kyselinou mravenčí ve vodě a mobilní fáze B 0,1% kyselinou

mravenčí v acetonitrilu. Jako vnitřní standard byl použit deuteriem značený JH III. Pro JH III byly v MS spektru naměřeny píky o m/z 267, 235 a 147.

Zhou et al. (2011) stanovovaly JH III v celých larvách matek a trubců pomocí LC – ESI – MS. Analýza byla provedena na koloně ZORBAX SB-Aq s mobilní fází skládající se z mobilní fáze A tvořené vodou a 0,1 % kyselinou mravenčí a mobilní fází B složenou z acetonitrilu a 0,1 % kyseliny mravenčí. JH III byl izolován z larev extrakčním činidlem isooktan-methanol. V MS spektru pro JH III byly zaznamenány píky o m/z 267, 235 a 217. Metoda byla optimalizována a částečně validována. Ve vzorcích kukel matek byl detekován JH III v koncentracích  $0,20 \pm 0,06 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ .

Pomocí plynové chromatografie detekovali Mauchamp et al. (1985) JH III z *Locusta migratoria*. JH III byl izolován extrakčním činidlem hexanem z *corpora allata*. Na MS spektru byly detekovány píky pro m/z 267, 235 a 252.

## **3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

### **3.1 Materiál**

#### **3.1.1 Biologický materiál**

Vzorky zimních včel, které byly dodány školitelem.

#### **3.1.2 Chemikálie**

Standard juvenilního hormonu III (Sigma-Aldrich®, USA)

Standard methoprenu (Sigma-Aldrich®, USA)

(Rac)-Juvenile Hormone III-D3 (ChemScene, USA)

Acetonitril (Fisher Chemical, Thermo Fisher Scientific, USA)

Isooktan (Fisher Chemical, Thermo Fisher Scientific, USA)

Methanol (Fisher Chemical, Thermo Fisher Scientific, USA)

Kyselina trifluoroctová (Sigma-Aldrich®, USA)

Mravenčan amonný (Sigma-Aldrich®, USA)

Kyselina mravenčí MS kvality (Fisher Chemical, Thermo Fisher Scientific, USA)

Voda MS kvality (Sigma-Aldrich®, USA)

#### **3.1.3 Použité roztoky a média**

90% roztok acetonitrilu + 0,1% kyseliny mravenčí

voda + 0,5% kyselina mravenčí

90% roztok acetonitril + 0,5% kyselina mravenčí

voda +  $10\mu\text{mol.l}^{-1}$  AmFA + 0,1% kyselina mravenčí

90% acetonitril + 0,1% kyselina mravenčí

### **3.2 Přístrojové vybavení**

HPLC systém UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific, USA)

Hmotnostní spektrometr Compact qTOF (Bruker Daltonics, Německo)

Homogenizátor Fast Prep FP120 (Thermo Fisher Scientific, USA)

Chlazená centrifuga 5415 R (Eppendorf, Německo)

Vortex (Stuart, UK)

Automatické pipety (Eppendorf, Německo)

Ultrazvuková lázeň Elmasonic (Elma Schmidbauer GmbH, Německo)

Vakuová odparka Concentrator plus (Eppendorf, Německo)

Digestoř (MERCİ, s.r.o., Česká republika)

Software Data Analysis – verze 1.4 (Bruker Daltonik, Německo)

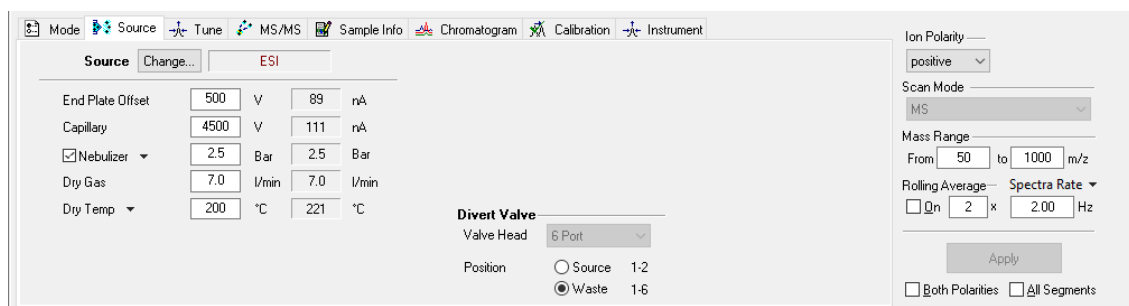
Software TASQ – verze 2023.04. 10051 (Bruker Daltonik, Německo)

Eppendorf protein LoBind® Tubes mikroskopavky (Eppendorf, Německo)

### 3.3 Metody

#### 3.3.1 Systémové nastavení hmotnostní spektrometrické analýzy

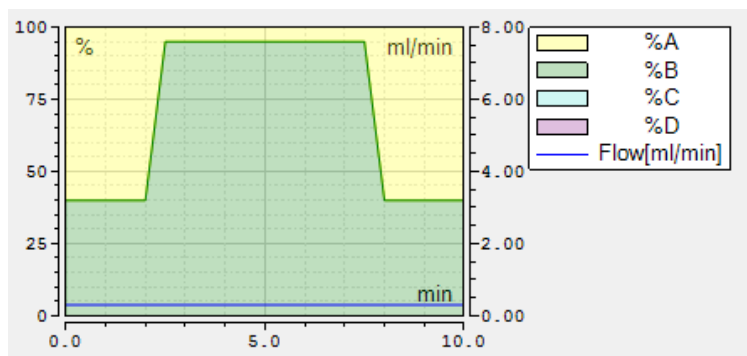
Systémové nastavení hmotnostního spektrometru pro UHPLC-ESI-QTOF analýzu standardů JH III a následnou analýzu biologických vzorků včel vypadalo následovně. Na obr. 5 je popsáno nastavení iontového zdroje. Měřilo se v módu ESI+. Rozmezí hodnot pro hmotnostní rozsah, ve kterém se měřilo, bylo nastavené na 50 – 1000 m/z. Jako sušící plyn byl použit dusík, který byl dávkován do iontového zdroje rychlostí 7 l/min pod tlakem  $2,5 \times 10^5$  Pa a při teplotě 200 °C.



Obrázek 5 Nastavení iontového zdroje pro UHPLC-ESI-QTOF analýzu.

### 3.3.2 Systémové nastavení HPLC

Pro chromatografickou separaci byla nejdříve vybrána vhodná kolona a mobilní fáze. Nástřik vzorku na kolonu byl 5  $\mu\text{l}$  a průtoková rychlost kolonou byla 400  $\mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$  při teplotě 30  $^{\circ}\text{C}$ . Průtokový gradient mobilní fáze je graficky vyobrazen na obr. 6 a popsán v tab. 1.



Obrázek 6 Nastavení průtokového gradientu mobilní fáze A (žlutě) a mobilní fáze B (zeleně).

Tabulka 1 Nastavení průtokového gradientu mobilní fáze A a mobilní fáze B pro HPLC analýzu.

čas (min)	Průtoková rychlost (ml/min)	%A	%B
0,0	začátek analýzy		
2,0	0,4	60	40
2,5	0,4	5	95
7,5	0,4	5	95
8,0	0,4	40	40
10,0	konec analýzy		

### 3.3.3 Optimalizace výběru vhodné kolony a mobilní fáze

Při optimalizaci metody UHPLC-ESI-QTOF pro detekci a kvantifikaci JH III bylo nejdříve třeba optimalizovat výběr vhodné chromatografické kolony. Pro optimalizaci byly použity tyto chromatografické kolony (Tab. 2). S použitím těchto kolon byly změřeny vzorky standardů JH III o koncentraci 2  $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .



Tabulka 2 Chromatografické kolony, které byly použity při optimalizaci metody.

kolona	Délka (mm)	velikost separovaných částic ( $\mu\text{m}$ )
C <sub>18</sub> UHPLC kolona Kinetex	150 × 2,1	1,7
Kinetex Phenyl-Hexyl kolona	100 × 2,1	1,7
Arion Astra C <sub>18</sub> – HE kolona	150 × 2,1	3
Arion C <sub>8</sub> HPLC kolona	150 × 2,1	3
C <sub>18</sub> ARION Polar® HPLC kolona	150 × 2,1	3

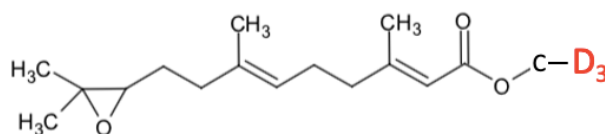
Dále se optimalizovalo použití vhodných mobilních fází. Pro optimalizaci byly použity dvě mobilní fáze MF1 (mobilní fáze tvořená 0,5% kyselinou mravenčí (FA)) a MF2 (mobilní fáze tvořená 10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$  mravenčanem amonným (AmFA) a 0,1% kyselinou mravenčí). Složení jednotlivých fází je uvedeno v tab. 3.

Tabulka 3 Složení mobilních fází použitých při analýze UHPLC-ESI-QTOF.

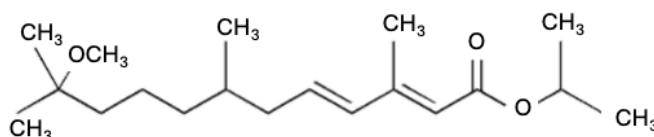
Název mobilní fáze	Mobilní fáze A	Mobilní fáze B
MF1	voda + 0,5% FA	90% acetonitril + 0,5% FA
MF2	voda + 10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ AmFA + 0,1% FA	90% acetonitril + 0,1% FA

### 3.3.4 Vnitřní standard

Pro výběr vhodného vnitřního standardu (IS) byl zvolen komerčně dostupný deuteriem značený juvenilní hormon III (Obr. 7) a analog juvenilního hormonu methopren (Obr. 8).



Obrázek 7 molekula deuteriem značeného (červeně) JH III



Obrázek 8 molekula methoprenu

### 3.3.5 Kvantifikace JH III metodou kalibrační přímky

Celkem byly připraveny čtyři kalibrační křivky, z nichž byla vybrána pro následnou kvantifikaci ta nejvhodnější. Jednotlivé kalibrační řady se lišily způsobem přípravy.

Kalibrační křivka 1 (Add) byla připravena přímým napipetováním do skleněných vialek. Do skleněných vialek se napipetoval JH III o příslušných koncentracích, 2,5  $\mu\text{l}$  10  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  roztoku vnitřního standardu methoprenu (MP) a vzniklý roztok se doplnil 90% acetonitrilem (AcN), tak aby výsledný objem roztoku ve vialce byl 50  $\mu\text{l}$ .

Kalibrační křivka 2 (Dry) byla připravena napipetováním JH III o příslušných koncentracích a 2,5  $\mu\text{l}$  10  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  roztoku vnitřního standardu MP do skleněných vialek. Vzniklá směs se nechala odpařit v rotační vakuové odparce (10 min, 30 °C). Vzniklý odparek se rozpustil v 50  $\mu\text{l}$  90% AcN. Vzorky se daly na 10 min do sonifikátoru a poté se 10 min centrifugovaly (16000  $\times$  g).

Kalibrační křivka 3 (Plast) byla připravena napipetováním JH III o příslušných koncentracích a 2,5  $\mu\text{l}$  10  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  roztoku vnitřního standardu MP do plastových mikrozkušavek. Vzniklá směs se nechala odpařit v rotační vakuové odparce (10 min, 30 °C). Vzniklý odparek se rozpustil v 50  $\mu\text{l}$  90% AcN. Vzorky se daly na 10 min do sonifikátoru a poté se 10 min centrifugovaly (16000  $\times$  g). Nakonec se roztok přepipetoval do skleněných vialek.

Kalibrační křivka 4 (LB vialky) byla připravena přímým napipetováním do low bind (LB) silylovaných vialek. Do LB vialek se napipetoval JH III o příslušných koncentracích, 5  $\mu\text{l}$  10  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  roztoku vnitřního standardu methoprenu (MP) a vzniklý roztok se doplnil 90% acetonitrilem (AcN), tak aby výsledný objem roztoku ve vialce byl 100  $\mu\text{l}$ .

### 3.3.6 Extrakce JH III z *Apis mellifera*

Pro extrakci juvenilního hormonu, jakožto lipofilní látky, byla použita směs isooktan - methanol. Extrakce směsí isooktan-methanol byla inspirována prací Zhou et al. (2011), kteří izolovali JH III z včelích larev. Juvenilní hormon se extrahoval buď z celé včely nebo z hemolymfy.

### 3.3.7 Odběr hemolymfy

Včely se uspaly plynným oxidem uhličitým. Byl jim ustříhnut zadeček a z thoraxu vytlačena kapka čisté hemolymfy. Automatickou pipetou byly odebrány 2  $\mu\text{l}$  čerstvě vytlačené hemolymfy a přeneseny do mikrozkušavky obsahující 100  $\mu\text{l}$  0,1% kyseliny trifluoroctové (TFA) nebo do mikrozkušavky obsahující pár zrněk fenylthiomocoviny (PTU). PTU blokuje aktivitu fenyloxidasy (EC 1.14.18.1) v hemolymfě a nedochází tak ke vzniku melaninu (Ryazanova et al., 2012). Vzorky obsahující 0,1% TFA se daly na 30 min vychladit do mrazáku (-80 °C) a pak se přes noc lyofylizovaly. Vzorky s PTU se zamrazily (-80 °C).

### 3.3.8 Extrakce JH III z celé včely

Do mikrozkušavky byla společně se třemi velkými skleněnými kuličkami vložena celá zamražená včela. Vzorky včel se daly vychladit na 30 min do mrazáku (-80 °C) a poté se homogenizovaly. K jednotlivým zhomogenizovaným vzorkům se přidalo 350  $\mu\text{l}$  methanolu, 210  $\mu\text{l}$  isooktanu a 5  $\mu\text{l}$  10  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  standardu methoprenu a vzorek resuspendoval pomocí vortexu. Vzorky se daly na 10 min do sonifikátoru a poté se 10 min centrifugovaly (10 000  $\times$  g). Isooktanová fáze se odebrala do nové mikrozkušavky. K methanolové fázi se přidalo 210  $\mu\text{l}$  isooktanu. Vzorky se opět sonifikovaly a centrifugovaly. Následně se opět odebrala izooktanová fáze a poté i methanolová fáze. Extrakční činidla se nechala odpařit ve vakuové odparce (cca 1 hod při 45 °C). Vzniklý odparek se rozpustil ve 100  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku (90% acetonitril + 0,1% FA). Vzorky se daly na 10 min do sonifikátoru a poté se 10 min centrifugovaly (16000  $\times$  g). Supernatant se odebral do nových mikrozkušavek, z nichž se následně odebralo 40  $\mu\text{l}$  do skleněných vialek k UHPLC-ESI-QTOF analýze.

### 3.3.9 Extrakce JH III z hemolymfy

Vzhledem k tomu, že extrakce JH III z celé včely nebyla vyhovující, zvolila se pro extrakci JH III včelí hemolymfa. Včelám byla odebrána hemolymfa. K jednotlivým vzorkům se přidalo 300  $\mu\text{l}$  methanolu, 175  $\mu\text{l}$  isooktanu a 5  $\mu\text{l}$  10  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  standardu methoprenu a vzorek se resuspendoval pomocí vortexu. Vzorky se daly na 10 min do sonifikátoru a poté se 5 min centrifugovaly (10 000  $\times$  g).

Isooktanová fáze se odebrala do nové mikrozkušavky. K methanolové fázi se přidalo 175  $\mu\text{l}$  isooktanu. Vzorky se opět sonifikovaly a centrifugovaly. Následně se opět odebrala izooktanová fáze a poté i methanolová fáze. Extrakční činidla se nechala odpařit ve vakuové odparce (cca 30 min při 30 °C). Vzniklý odparek se rozpustil ve 10  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku (90% acetonitril + 0,1% FA). Vzorky se daly na 10 min do sonifikátoru a poté se 10 min centrifugovaly (16000  $\times$  g).

Supernatant se odebral do nových mikrozkušavek, z nichž se následně odebralo 40  $\mu\text{l}$  do skleněných vialek k UHPLC-ESI-QTOF analýze. Při extrakci JH III hemolymfy se optimalizovalo použití vhodného typu mikrozkušavek a vialek.

### **3.3.10 Optimalizace vhodného spotřebního materiálu**

Porovnávaly se výsledky z měření, kdy byla extrakce provedena v low bind (LB) silylovaných mikrozkušavkách (Eppendorf protein LoBind® Tubes) oproti plastovým mikrozkušavkám (Eppendorf). LB mikrozkušavky na svém povrchu obsahují směs polymerů, které vytvářejí hydrofilní vrstvu a brání tak adhezi látek k plastu. Dále se porovnávalo, zda má nějaký vliv použití LB silylovaných vialek (Deactivated Clear Glass 12  $\times$  32 mm Screw Neck Vial, Total Recovery) nebo, zda jsou pro UHPLC – ESI – QTOF analýzu vyhovující skleněné total recovery vialky. LB silylované vialky by měly stejně jako LB mikrozkušavky minimalizovat adhezi látek ke sklu a zajistit tak vyšší výtěžnost.

### **3.3.11 Stanovení návratnosti metody**

Byly připraveny tři duplikáty skupin vzorků obsahujících 5  $\mu\text{l}$  10  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  roztok vnitřního standardu methoprenu a JH III. První skupina obsahovala JH III o finálním látkovém množství v nástřiku 1 pmol, druhá skupina 2,5 pmol a třetí skupina 5 pmol. Jednotlivé vzorky byly doplněny 90 % AcN do celkových 50  $\mu\text{l}$ . Polovina vzorků z každé skupiny prošla před UHPLC-ESI-QTOF analýzou procesem extrakce. Postup extrakce byl stejný jako postup extrakce pro vzorky hemolymfy. Druhá polovina vzorků z každé skupiny byla ihned po napipetování do LB vialek změřena.

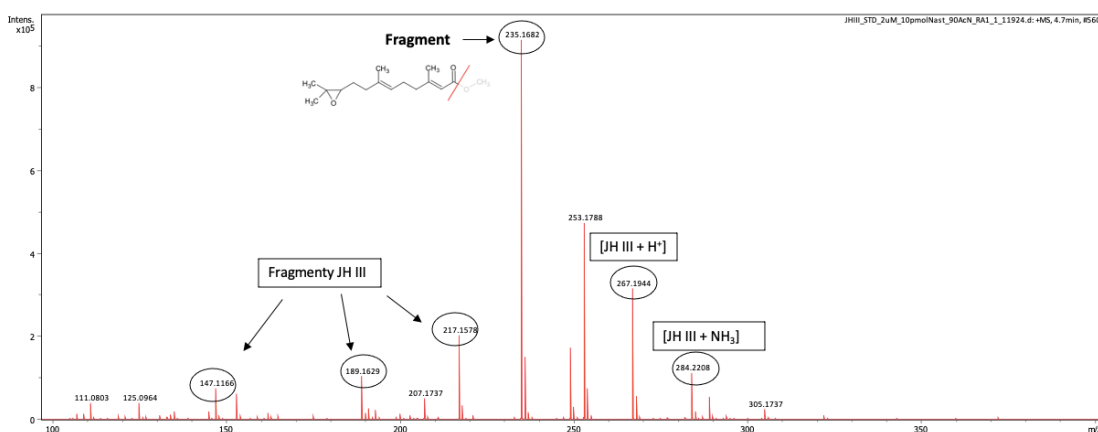
### **3.3.12 Kvantifikace JH III pomocí metody standardního přídatku**

Vzorek obsahující 40  $\mu\text{l}$  čerstvě odebrané hemolymfy do 200  $\mu\text{l}$  0,1% TFA byl rozdělen na čtyři alikvoty po 50  $\mu\text{l}$ . Ke všem vzorkům byl přidáno 5  $\mu\text{l}$  10  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  vnitřního standardu methopren. První vzorek byl bez přídatku JH III. K prvnímu vzorku byl přidán 200  $\text{nmol.l}^{-1}$  JH III, k třetímu 500  $\text{nmol.l}^{-1}$  JH III a čtvrtému 1000  $\text{nmol.l}^{-1}$  JH III. Vše bylo provedeno v pěti opakováních. Vzorky se přes noc lyofilizovaly a následující den se provedla extrakce vzorků a kvantifikace JH III.

## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 MS spektrum pro JH III

JH III se v průběhu analýzy samovolně rozpadá odštěpením  $-OCH_3$  skupiny na fragment  $m/z$  235, 17 (Obr. 9). Tento fragment je nejvíce zastoupen ve JH III. Dále se rozpadá na ionty o  $m/z$  147,12; 189,17 a 217,16. Kromě fragmentů se také JH III nachází v protonizované formě ( $m/z$  267,19) nebo vytváří adukt s amoniakem ( $m/z$  284,22).

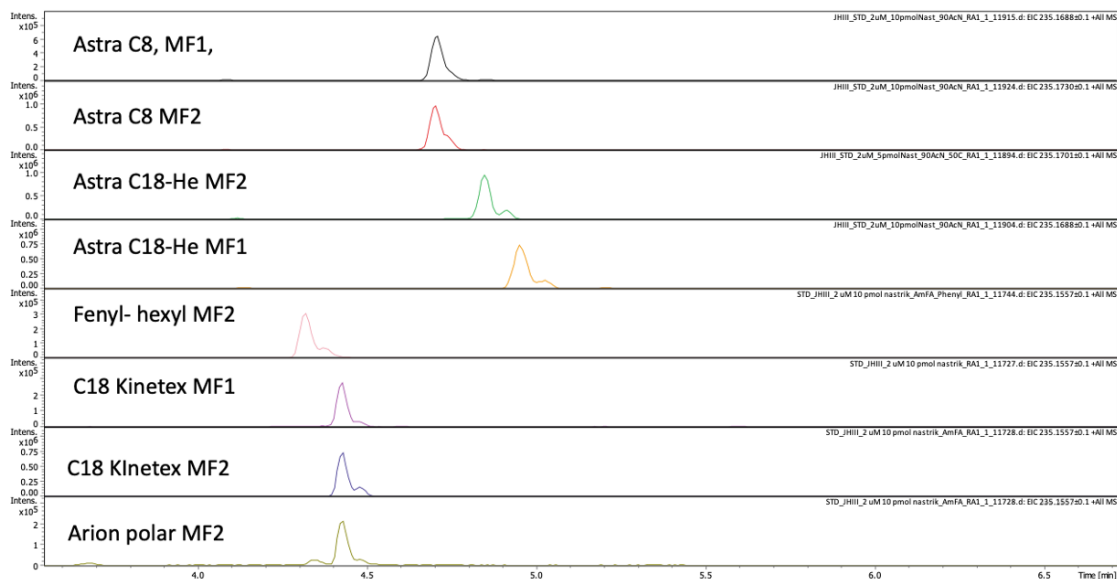


Obrázek 9 MS spektrum JH III (10 pmol v nástřiku). Astra C<sub>8</sub> kolona, MF2. Nejvíce zastoupen fragment o  $m/z$  235,17.

### 4.2 Optimalizace použití vhodné kolony a mobilní fáze pro detekci a kvantifikaci JH III

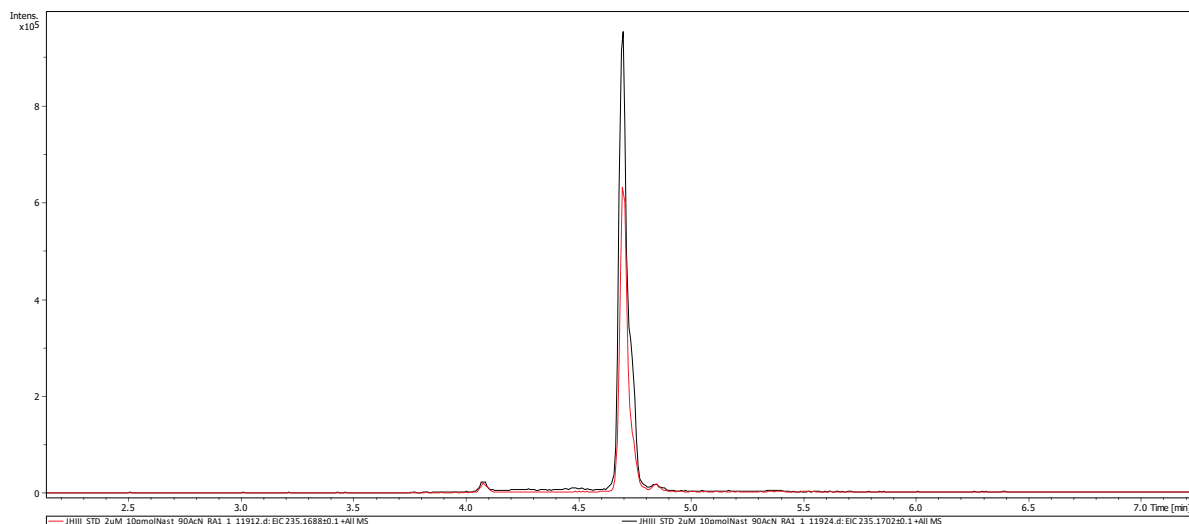
Na obr. 10 můžeme vidět separační vlastnosti jednotlivých kolon a jak se mění tvar píku na extrahovaném chromatogramu pro fragment  $m/z$  235,17. Mobilní fáze 1 (MF1) byla tvořena mobilní fází A<sub>1</sub> (voda + 0,5% kyselinou mravenčí) a B<sub>1</sub> (90% acetonitril + 0,5% kyselinou mravenčí (FA)). Mobilní fáze 2 (MF2) byla tvořena mobilní fází A<sub>2</sub> (voda + 10  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  AmFA + 0,1% FA) a B<sub>2</sub> (90% acetonitril + 0,1% FA).

Nejlepší tvar píku měl standard JH III při použití Arion Astra C<sub>8</sub> kolony s mobilní fází MF2 (mobilní fáze tvořená 10  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  AmFA a 0,1% FA). Tato kolona byla poté použita pro další měření. U ostatních kolon můžeme vidět, že tvar píku je nepravidelný a vzniká dvojpík, který není žádoucí pro kvantifikaci látky.



Obrázek 10 Extrahované chromatogramy pro fragment  $m/z$  235,17 pro jednotlivé kolony za použití MF1 (FA) nebo MF2 (AmFA + FA). Nástřik JH III byl 10 pmol.

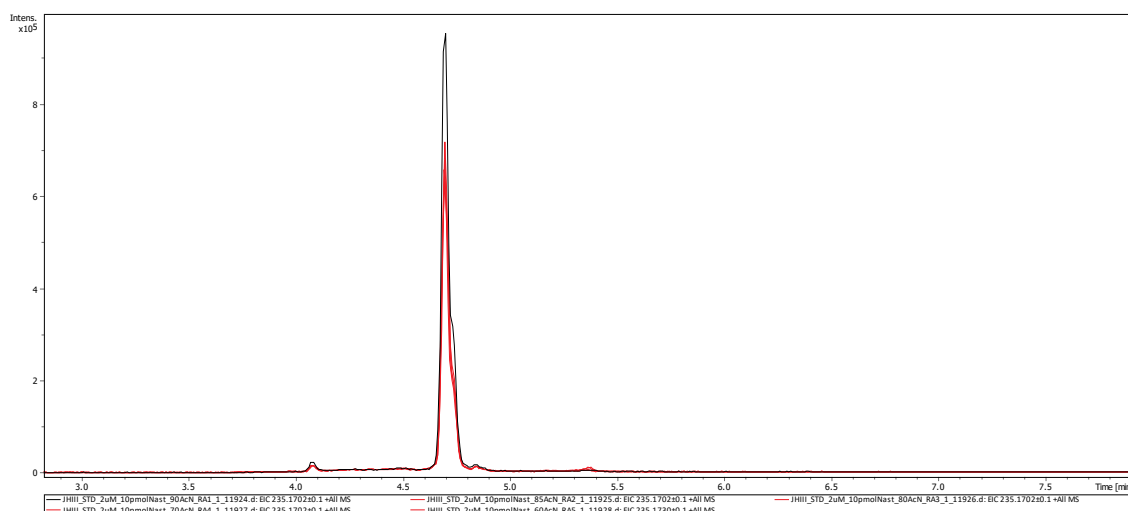
Dále se optimalizoval se výběr mobilní fáze. Jak je vidět na obr 11. tak u MF2 ( $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$  AmFA+ 0,1% FA) je téměř dvojnásobně vyšší intenzita než je tomu u MF1. Zároveň při použití MF2 ( $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$  AmFA+ 0,1% FA) došlo ke zvětšení plochy píku  $1,8 \times$  oproti MF1 (AcN + 0,5% FA). MF2 ( $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$  AmFA+ 0,1% FA) byla zvolena jako mobilní fáze pro další měření.



Obrázek 11 Kolona Astra C<sub>8</sub>. Překrývající se chromatogramy. Nástřik JH III byl 10 pmol. Červeně MF1(0,5% FA) - plocha píku 1478777, a černě MF2 ( $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$  AmFA + 0,1 % FA) - plocha píku 2637262.

### 4.3 Optimalizace vhodného rozpouštědla pro JH III

Acetonitril (AcN) je hojně používané aprotické polární rozpouštědlo. Zhou et al. (2011) a Ramirez et al. (2016) používal pro rozpuštění JH III AcN obohacený o 0,1% kyselinu mravenčí (FA). Ramirez et al. (2016) používali 100% AcN a Zhou et al. (2011) 90 % AcN. Byl tedy ověřován vliv koncentrace AcN na tvar a plochu píku pro JH III a jeho intenzitu. Rozdílné koncentrace AcN by totiž mohly ovlivnit rozpustnost JH III v AcN, což by mohlo vést k nepřesným hodnotám o změřeném množství JH III nebo k posunu retenčního času. Na obr. 12 jsou extrahované chromatogramy pro fragment  $m/z$  235,17 pro měření standardů JH III rozpuštěných v různých koncentracích AcN. Při použití 90% AcN byla zaznamenána výrazně vyšší intenzita a plocha píku (Tab. 4) v porovnání s ostatními koncentracemi AcN 85%, 80%, 70% a 60%).



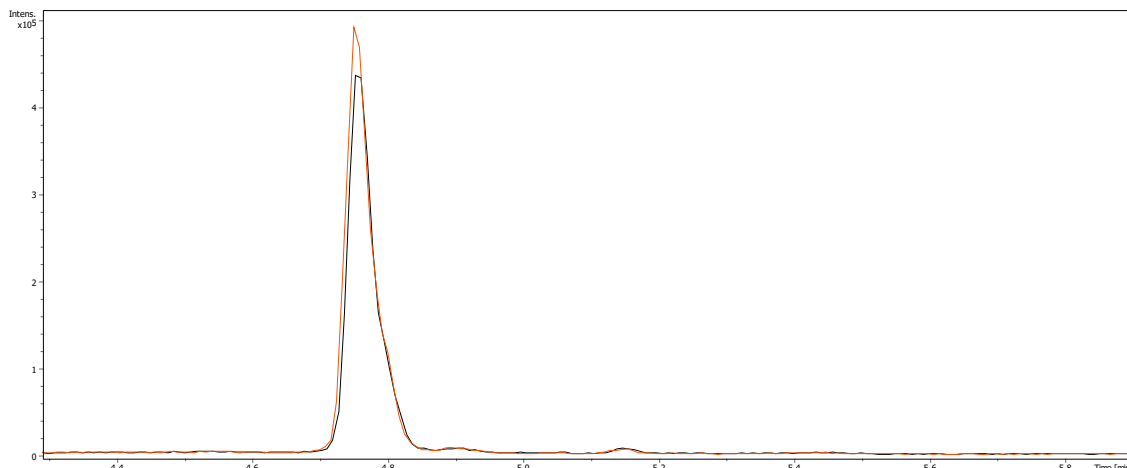
Obrázek 12 Astra C<sub>8</sub> kolona. Extrahované chromatogramy  $m/z$  235,17 pro JH III (10 pmol) rozpuštěném v 90% AcN (černá), 85% AcN (červená), 80% AcN (červená), 70% AcN (červená) a 60% AcN (červená).

Tabulka 4 Plochy píků extrahovaných chromatogramů o  $m/z$  235,17 pro pro různé koncentrace AcN, ve kterém byl rozpuštěn standard JH III (10 pmol),

koncentrace AcN	plocha píku
90%	2746653
85%	1647986
80%	1801870
70%	1766688
60%	1899361



Dále se zkoumal vliv okyselení přidavkem 0,1% kyseliny mravenčí (FA). Intenzita měření JH III rozpuštěném v 90% AcN bez přidavku FA byla vyšší (Obr. 13). Proto bylo zvoleno jako vhodné rozpouštědlo pro JH III čistý 90% AcN bez přidavku 0,1% FA.

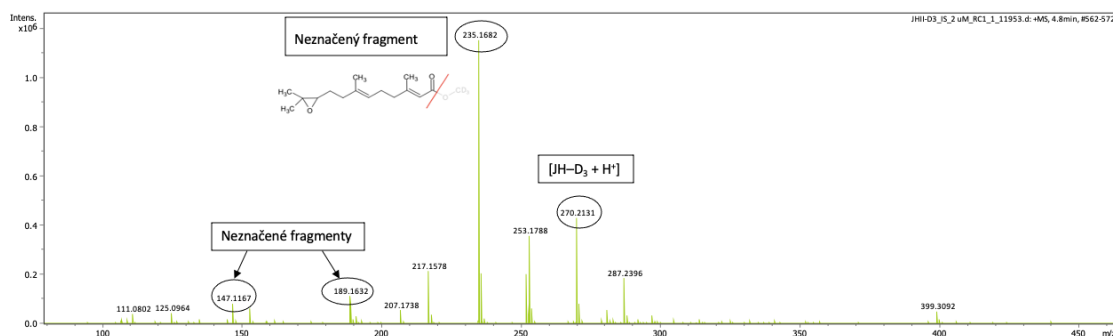


Obrázek 13 Porovnání vlivu přidavku 0,1% kyseliny mravenčí na intenzitu změřeného píku JH III (5 pmol). Vyšší intenzita zaznamenána u čistého 90% AcN (červená barva). Černou barvou je znázorněn pík pro JH III rozpuštěný v 90% AcN + 0,1% FA.

## 4.4 Vnitřní standard

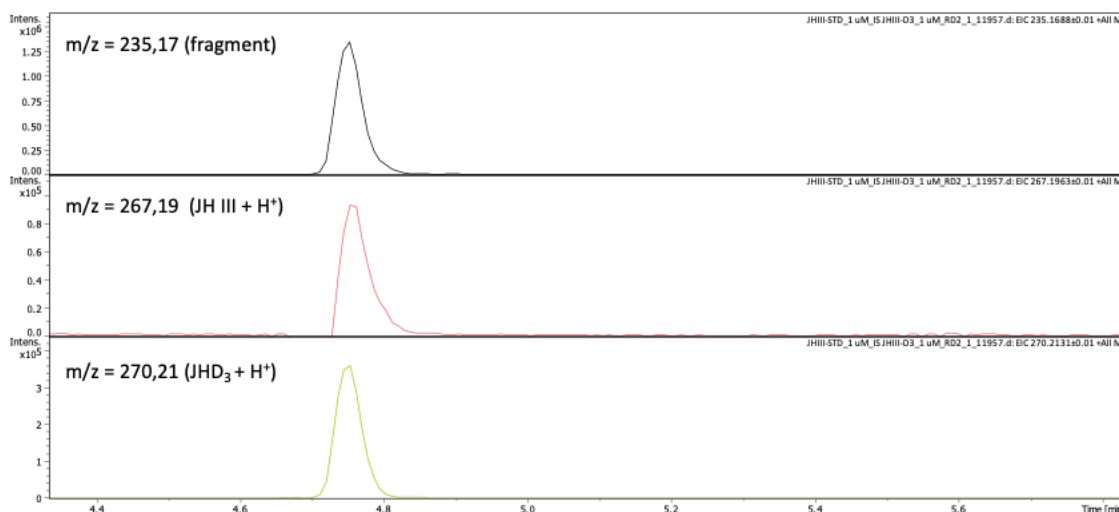
### 4.4.1 Chromatografické chování a MS spektrum pro značený JH-D<sub>3</sub>

JH -D<sub>3</sub> je komerčně dostupný izotopově značený juvenilní hormon využitelný jako interní standard. Při analýze UHPLC–ESI–QTOF se ale štěpil na neznačený fragment  $m/z$  235, 17 (Obr. 14), tedy stejný fragment, na který se rozpadá JH III. Dále byl zaznamenán signál pro  $[JH-D_3 + H^+]$  o  $m/z$  270,21 a další fragmenty s výrazně nižší intenzitou signálu v porovnání s fragmentem 215,17.



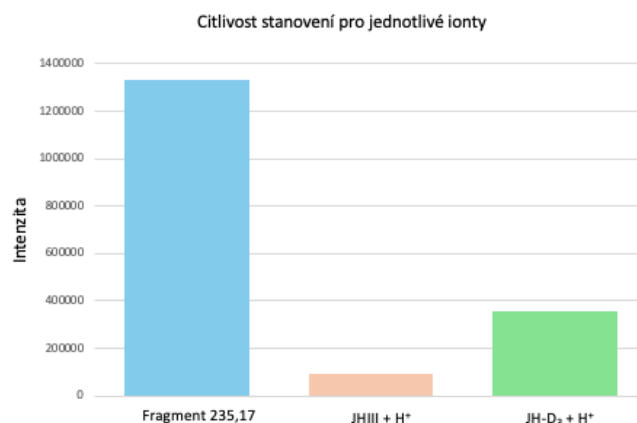
Obrázek 14 MS spektrum pro JH-D<sub>3</sub> (10 pmol). JH-D<sub>3</sub> se během ionizace rozpadá na neznačený fragment  $m/z$  235,17.

Při hmotnostně spektrometrickém měření docházelo k samovolné fragmentaci JH III a JH-D<sub>3</sub> na o m/z 235,17. Použití tohoto izotopově značeného standardu není pro měření v jednoduchém MS módu možné. Využití JH-D<sub>3</sub> jako interního standardu by našlo využití v případě použití měřícího módu MRM, kdy je možné na prvním kvadrupólu vyselektovat prekurzorový iont. V hmotnostním spektru vznikaly i ionty s nižší intenzitou. Jednalo se o protonizované molekuly [JH-D<sub>3</sub> + H<sup>+</sup>] (m/z 270,21) a [JH III + H<sup>+</sup>] (m/z 267,19) (Obr. 15).



Obrázek 15 Astra C<sub>8</sub> kolona, MF2. JH III (5 pmol) + JH-D<sub>3</sub> (5 pmol). Extrahované chromatogramy pro m/z 267,19 (plocha píku 149205) a m/z 270 (plocha píku 874423).

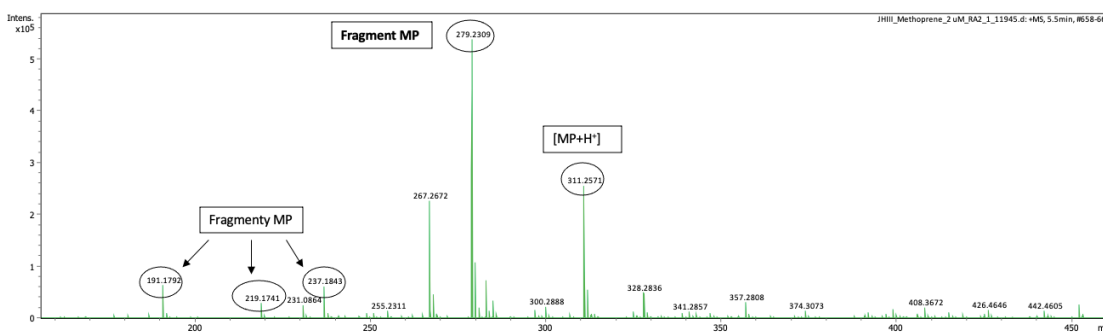
Při fragmentaci vznikal neznačený iont o m/z 235,17, který měl nejvyšší intenzitu. Ionty pro protonizovaný JH III a deuteriem značený JH měli oproti tomuto fragmentu mnohonásobně nižší intenzitu (Obr. 16) Intenzita [JH III + H<sup>+</sup>] byla v porovnání s [JH - D<sub>3</sub> + H<sup>+</sup>] třetinová. Kvůli nízké intenzitě v hmotnostním spektru ale není vhodné použít tyto dva ionty pro kvantifikaci JH III.



Obrázek 16 JH III (5 pmol) + JH-D<sub>3</sub> (5 pmol): Graf ukazuje intenzity píků pro jednotlivé ionty, které byly změřeny při spektrometrické analýze.

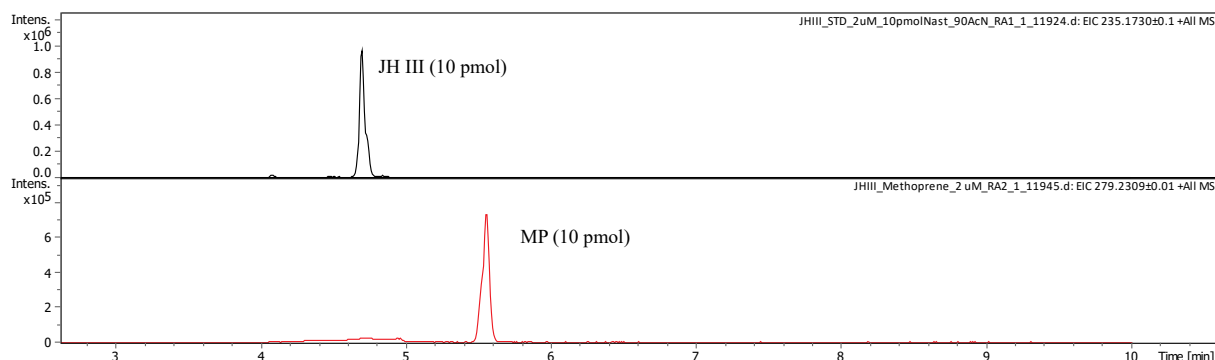
#### 4.4.2 Chromatografické chování a MS spektrum pro methopren

Vzhledem k tomu, že se JH-D<sub>3</sub> ukázal jako nevhodný vnitřní standard pro kvantifikaci JH III, byl zvolen jako vnitřní standard analog JH III – methopren. Methopren používali jako vnitřní standard ke kvantifikaci JH III např. Ares et al., (2012), kteří používali LC – ESI-MS/MS a měřili v MRM módu, nebo Chen et al., (2007), kteří používali měřili pomocí HPLC-ESI-MS/MS v SIM módu. Typickým iontem (Obr. 17) pro MP je fragment o m/z 279,23. Dále to jsou fragmenty o m/z 191,18; 219,18; 237,19 nebo protonizovaný MP o m/z 311,26.



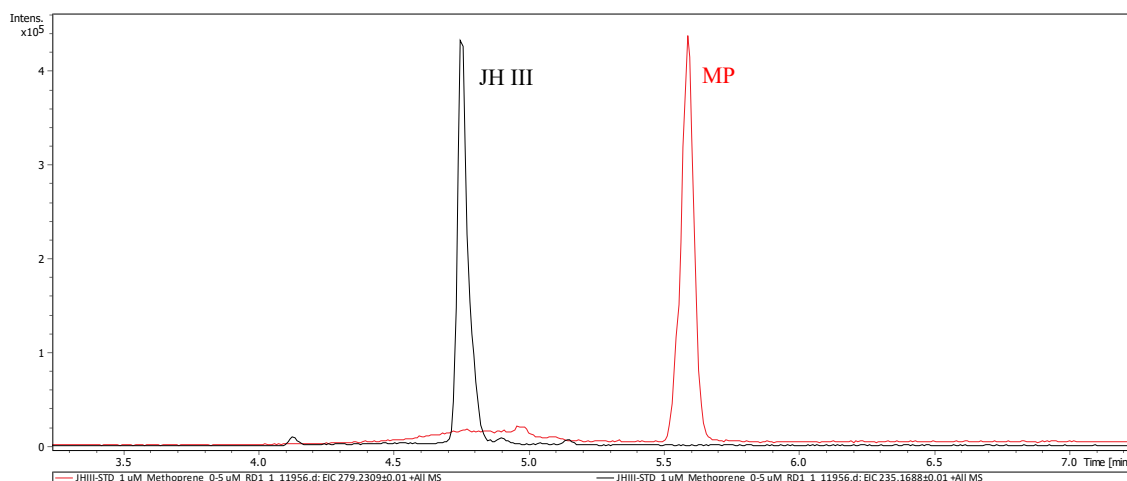
Obrázek 17 MS spektrum pro MP (10 pmol). Nejvíce zastoupený fragment o m/z 279,23.

Methopren se z C<sub>8</sub> kolony eluuje cca 1 min po JH III, tedy okolo 5,5 min. Na obr. 18 můžeme vidět porovnání extrahovaných chromatogramů pro MP (m/z 279,23) a JH III (m/z 235,17).



Obrázek 18 Astra C<sub>8</sub> kolona, MF2: extrahované chromatogramy pro MP (m/z 279,23) a JH III (m/z 235,17). Nástřík obou standardů na kolonu byl 10 pmol.

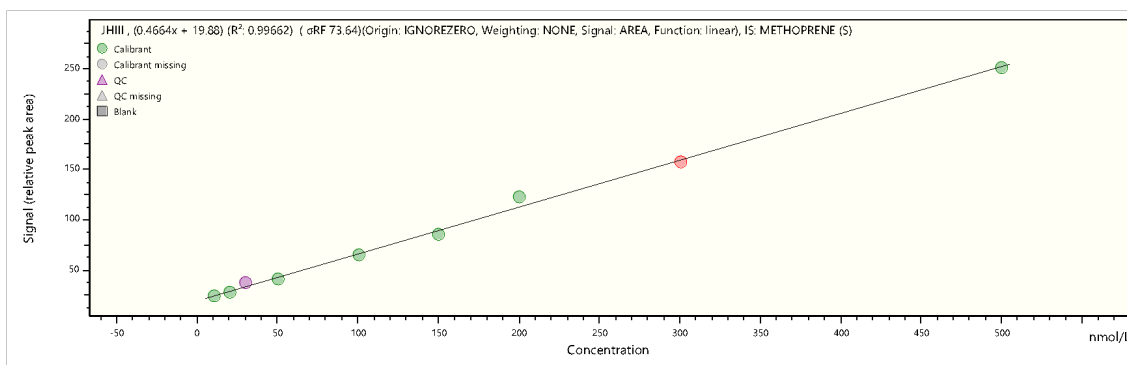
Následně bylo provedeno měření standardu obsahujícího směs JH III a MP rozpuštěných v 90% AcN (Obr. 19). Tím se JH III z kolony eluuje o minutu dříve než MP a obě látky lze od sebe odlišit.



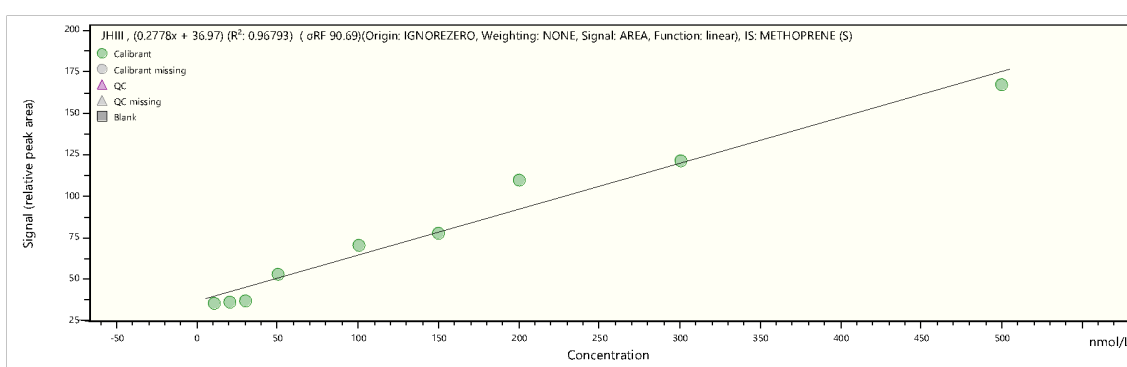
Obrázek 19 C<sub>8</sub> kolona, MF2. Vzorek obsahující JH III (5 pmol) a MP (2,5 pmol) rozpuštěných v 90% AcN. Na chromatogramu jsou extrahované chromatogramy pro JH III m/z 235,17 (černá) a MP m/z 279,23 (červená).

## 4.5 Kalibrační řada

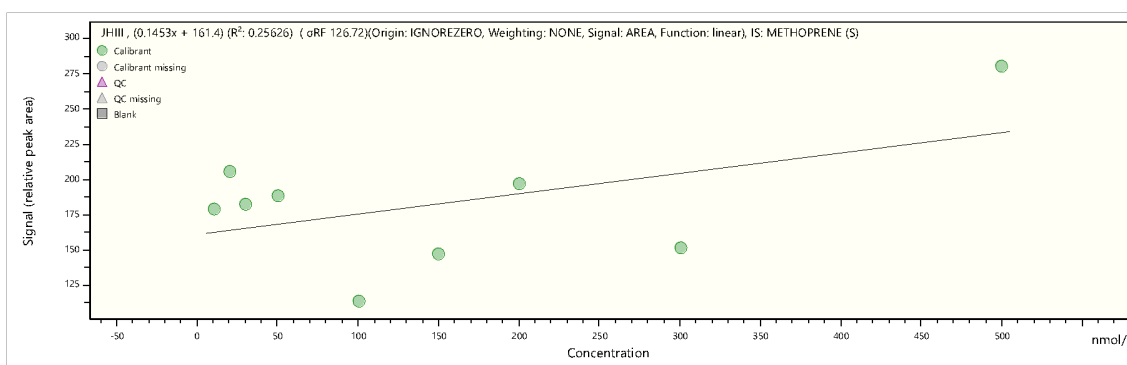
Celkem byly sestrojeny čtyři kalibrační řady s různým postupem přípravy. Kalibrační křivky 1-3 (Obr. 20 – 22) nebyly vhodné pro následnou kvantifikaci vzorků. U těchto kalibračních křivek byly použity skleněné vialky. Při zpracování vzorků docházelo ke ztrátám interního standardu i analytu, především při použití plastových mikrozkuvek v kombinaci s odpařováním směsi v rotační vakuové odparce. To pak vedlo k nepřesnému měření, což můžeme vidět na hodnotách determinačního koeficientu  $R^2$ , který byl např. u kalibrační křivky č. 3:  $R^2 = 0,256$ .



Obrázek 20 Kalibrační křivka č. 1 (Add) – kalibrační řada byla připravena přímým napipetováním methoprenu a JH III o příslušné koncentraci do skleněných vialek a doplněna roztokem 90% acetonitrilu do 50  $\mu$ l.

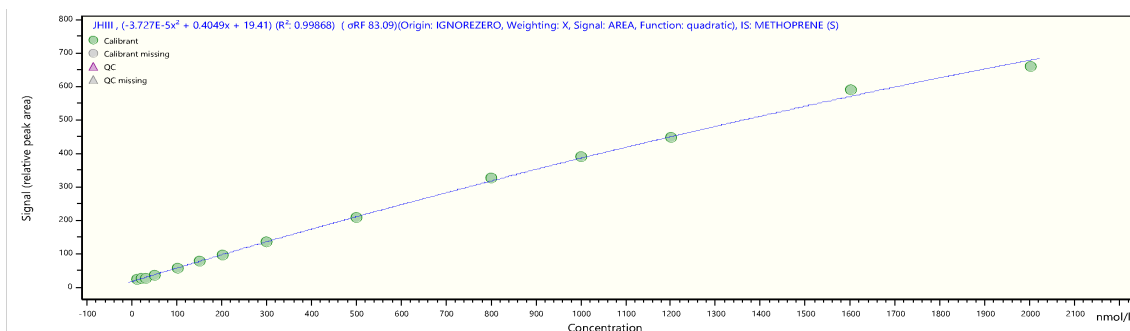


Obrázek 21 Kalibrační křivka č. 2 (Dry) Kalibrační řada byla připravena napipetováním JH III a MP o příslušných koncentracích do skleněných vialek. Směs se nechala odpařit v rotační vakuové odparce a vzniklý odparek se resuspendoval v 50  $\mu$ l 90% acetonitrilu.



Obrázek 22 Kalibrační křivka č. 3 (Plast) - Kalibrační řada byla připravena napipetováním JH III a MP o příslušných koncentracích do plastových mikrozkušavek. Směs se nechala odpařit v rotační vakuové odparce a vzniklý odparek se resuspendoval v 50  $\mu$ l 90% acetonitrilu.

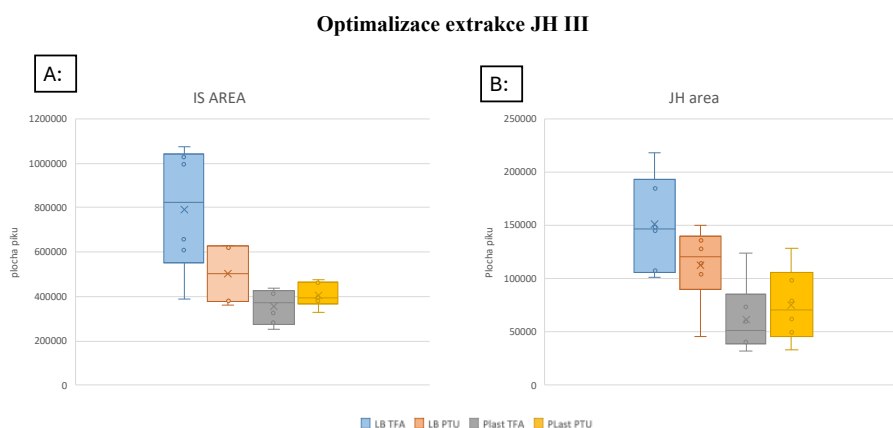
Kalibrační křivka č. 4 (Obr. 23) byla zvolena pro kvantifikaci JH III. Kalibrační řada byla připravena do LB silylovaných vialek. Ze sestavené kalibrační křivky o 14 bodech v koncentračním rozmezí 10 – 200 nmol.l<sup>-1</sup> (kvadratická regrese  $y = -3,727 \cdot 10^{-5}x^2 + 0,4049x + 19,41$ ;  $R^2 = 0,99868$ ) bylo následně možné kvantifikovat JH III v biologických vzorcích včely medonosné.



Obrázek 23 Kalibrační křivka č. 4 (LB vialky) - kalibrační řada byla připravena přímým napipetováním methoprenu a JH III o příslušné koncentraci do LB silylovaných vialek a doplněna roztokem 90% acetonitrilu do 50 µl.

#### 4.6 Optimalizace vhodného spotřebního materiálu pro extrakci JH III z *Apis mellifera* a zpracování odebrané hemolymfy

Na základě změřených výsledků (Obr. 24) byly zvoleny pro extrakci JH III z hemolymfy LB silylované mikrozkumavky. Při použití LB mikrozkumavek docházelo k nižším ztrátám IS a JH III oproti plastovým mikrozkumavkám. Zároveň se lepších výsledků dosáhlo použitím 0,1% kyseliny trifluoroctové (TFA) při odběru hemolymfy oproti použití fenylthiomocoviny (PTU).



Obrázek 24 Porovnání ploch extrahovaného chromatogramu fragmentu 279, 23 pro methopren (interní standard) (A) a ploch extrahovaného chromatogramu fragmentu 235,17 pro JH III (B) při použití různého spotřebního materiálu a zpracování odebrané hemolymfy. Pro každou skupinu vzorků (10 µl hemolymfy z pěti včel) bylo provedeno šest opakování.

## 4.7 návratnost metody

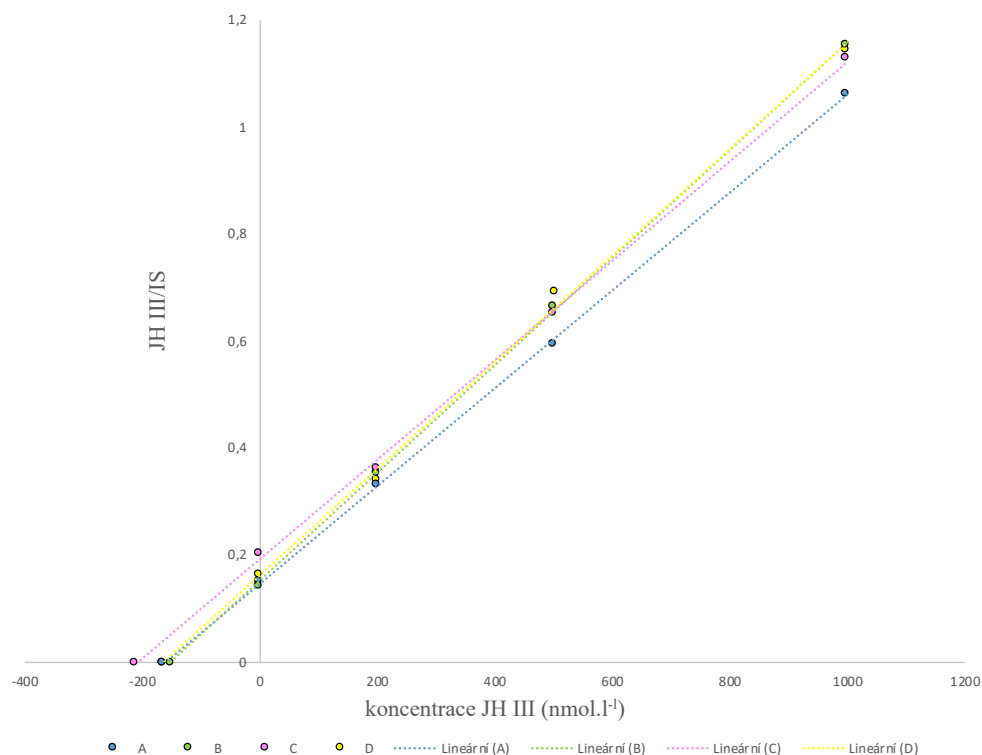
Porovnával se vliv extrakce na ztráty JH III a IS. V tab. 5 jsou uvedeny hodnoty pro výtěžnost u jednotlivých koncentračních hladin JH III. V průběhu extrakce docházelo ke ztrátám jak IS methoprenu tak i JH III. Výtěžnost metody byla v průměru pro IS  $55 \pm 7,5$  % a  $87 \pm 4,5$  % pro JH III.

Tabulka 5 Vliv extrakce na velikost plochy píku pro IS a JH III.

přidané množství JH III	n	průměrná plocha píku pro IS		průměrná plocha píku pro JH III		plocha píku	
		Bez extrakci (100 %)	po extrakci	bez extrakce (100 %)	po extrakci	výtěžnost IS	výtěžnost JH III
1 pmol	5	2508124	1632414	417141	389993	65 %	93 %
2,5 pmol	5	2784681	1348700,6	991008	821037	48 %	83 %
5 pmol	5	2854359	1433697	1716530	1469665	50 %	86 %
					průměr	55 %	87 %

## 4.8 Kvantifikace JH III pomocí metody standardních přídavek

Další metodou jak kvantifikovat JH III ve vzorku, je kromě sestrojení externí kalibrační řady, metoda dvou standardních přídavek. K neznámé koncentraci hemolymfy, která byla pro vzorky jednotlivých skupin (A-D) stejná byl ke vzorkům přidán IS methopren a různé přídávky JH III (1 pmol, 2,5 pmol a 5 pmol). Z naměřených dat byl sestrojen graf (Obr. 25) a vypočtena koncentrace JH III ( $C_x$ ) ve vzorcích hemolymfy (Tab. 6), která byla  $230,5 \pm 30,5$  pg. $\mu$ l<sup>-1</sup>. Rozdílné hodnoty ve vzorcích hemolymfy zimních včel jsou dány biologickou variabilitou vzorků.



Obrázek 25 Kvantifikace JH III metodou dvou standardních přidavků. Písmena A-B představují skupiny vzorků hemolymfy, z kterých byly následně odebrány alikvoty. K odebraným alikvotům hemolymfy byl přidán IS o konstantní koncentraci a JH III o různých koncentracích.

Tabulka 6 Porovnání parametrů lineárních přímek a vypočtené koncentrace hemolymfy pomocí metody dvou standardních přidavků.

Skupina	rovnice přímky lineární regrese	koefficient determinace ( $R^2$ )	$c_x$ JH III ( $\text{nmol.l}^{-1}$ )	$c$ v $1 \mu\text{l}$ hemolymfy ( $\text{pg} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ )
A	$y = 0,0009 x + 0,1481$	0,9999	163,8	219,8
B	$y = 0,001x + 0,1509$	0,9998	150,4	201,8
C	$y = 0,0009 x + 0,1919$	0,9994	210,1	281,9
D	$y = 0,001x + 0,1625$	0,9994	162,8	218,5



## 5 Diskuse

Cílem práce bylo optimalizovat metodu UHPLC-ESI-QTOF pro detekci a kvantifikaci juvenilního hormonu III z *Apis mellifera*. V průběhu analýzy se JH III samovolně rozpadal na fragment o  $m/z$  235, 17, tedy stejný pík jako zaznamenaly Ares et al. (2012), Chen et al. (2007), Ramirez et al. (2020) a Zhou et al. (2011) při MS analýze. Dále byl detekován pík pro protonizovaný JH III o  $m/z$  267,19, který zmiňují Ares et al. (2012), Chen et al. (2007), Ramirez et al. (2020), Zhou et al. (2011) a adukt JH III s amoniakem, který detekoval Mauchamp et al. (1985). JH III se dále fragmentoval na menší molekuly o  $m/z$  147, 11; 189,12 a 217, 15. Píky pro tyto hodnoty byly taktéž zaznamenány v literatuře (Chen et al., 2007; Ramirez et al., 2020, Zhou et al., 2011). Westerlund et Hoffman (2004) nebo Ramirez et al., (2016) zmiňují ještě adukt JH III se sodíkem ( $m/z$  289).

Pro optimalizaci chromatografické kolony bylo vyzkoušeno celkem pět chromatografických kolon založených na separaci na reverzní fázi: C<sub>18</sub> UHPLC kolona Kinetex (150 × 2,1 mm), Kinetex Phenyl-Hexyl kolona (150 × 2,1 mm), Arion Astra C<sub>18</sub>- He kolona (150 × 2,1 mm), Arion C<sub>8</sub> HPLC kolona (150 × 2,1 mm) a C<sub>18</sub> Arion Polar® kolona (150 × 2,1 mm). Nejlepší tvar píku měl standard JH III při použití Arion C<sub>8</sub> kolony, která byla zvolena pro další měření. U ostatních kolon byl tvar píku nepravidelný a vznikal dvojpík, což nebylo vhodné pro následnou kvantifikaci JH III. V publikovaných studiích byly pro detekci JH III zvoleny tyto kolony na reverzní fázi: Synergi Hydro-RP (Ares et al., 2012), Xbridge BEH Phenyl kolona (Ramirez et al., 2020), kolona ZORBAX SB-Aq (Zhou et al., 2011), C<sub>18</sub> kolona (Chen et al., 2007), C<sub>18</sub> ReproSil-Pur ODS-3 kolona (Westerlund et Hoffman, 2004) a Dionex Acclaim 120 C<sub>18</sub> kolona (Ramirez et al., 2016).

Bylo optimalizováno použití vhodné mobilní fáze. Nejdříve byla vyzkoušena mobilní fáze 1 (MF1) tvořená A<sub>1</sub> (voda + 0,5% kyselina mravenčí) a B<sub>1</sub> (90% acetonitril (AcN) + 0,5% kyselina mravenčí (FA)). Stejnou mobilní fázi použili pro měření Ramirez et al. (2016, 2020) a Zhou et al. (2011). Oproti tomu Chen et al. (2007) a Westerlund et Hoffman (2004) použili mobilní fázi tvořenou vodou (A) a methanolem (B). Ares et al. (2012) použili jako mobilní fázi kombinaci 20  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  roztoku mravenčanu amonného (AmFA) a methanolu, protože AmFA by měl zlepšovat ionizaci JH III a usnadnit následnou MS analýzu. Na základě toho byla zvolena MF2, která byla tvořena mobilní fází A<sub>2</sub> (voda + 10  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  AmFA + 0,1% FA) a B<sub>2</sub> (90% acetonitril

+ 0,1% FA). Použitím MF2 bylo dosaženo lepších výsledků, kdy došlo ke zvýšení intenzity a plochy píku JH III oproti MF1.

Jako vhodné rozpouštědlo pro JH III byl zvolen 90% acetonitril. Zhou et al. (2011) a Ramirez et al. (2016) používal pro rozpuštění JH III AcN obohacený o 0,1% FA. Ramirez et al. (2016) používali 100% AcN a Zhou et al. (2011) 90 % AcN. Byl tedy ověřován vliv koncentrace AcN (90%, 85%, 80%, 70% 60%) a přídavek 0,1% FA na tvar a plochu píku pro JH III. Nejlepšího tvaru píku a plochy píku se dosáhlo rozpuštěním JH III v 90% AcN.

Pro kvantifikaci bylo třeba vybrat vhodný vnitřní standard. V úvahu přicházely deuteriem značený juvenilní hormon, který použili např. Ramirez et al. (2016, 2020), nebo methopren, což je analog juvenilního hormonu, který při aplikaci napodobuje funkce JH v živých organismech a je strukturně podobnou látkou JH III (Ares et al., 2012; Chen et al., 2007; Westerlund et Hoffman, 2004). Při fragmentaci JH -D<sub>3</sub> docházelo ke ztrátě deuteriem značené -OCD<sub>3</sub> skupiny za vzniku fragmentu o m/z 235,17 - tedy stejného iontu, na který se rozpadal i nezačený JH III. Použití tohoto izotopově značeného standardu se nejvíce hodí pro měření v jednoduchém MS módu. Využití JH-D<sub>3</sub> jako interního standardu by našlo uplatnění v případě použití měřicího módu MRM, kdy je možné na prvním kvadrupólu vyselektovat prekurzorový iont jako to udělali Ramirez et al. (2016). Ramirez et al. (2016) za použití JH-D<sub>3</sub> jako vnitřního standardu, použili MS/MS fragmentační přechody 267 → 235 (JH III) a 270 → 235 (JH-D<sub>3</sub>) jako primární fragmentační přechod a 267 → 147 (JH III) a 270 → 147 (JH-D<sub>3</sub>) jako sekundární fragmentační přechod. Na základě vyselektovaných iontů v MRM módu pak byli schopni kvantifikovat JH III.

Jako vnitřní standard byl nakonec zvolen analog JH III methopren (MP), který použili ke kvantifikaci JH III např. Ares et al. (2012), Chen et al. (2007) a Westerlund et Hoffman (2004). MP se eluoval z kolony zhruba 1 min po JH III a bylo ho možné odlišit od JH III. Nejvyšší zastoupení měl v MS spektru standardu MP fragment o m/z 279,23. Dále byly detekovány fragmenty o m/z 191,18; 219,18; 237,19 nebo protonizovaný MP o m/z 311,2. Všechny tyto ionty byly shodné s ionty detekovanými v dalších publikacích (Ares et al., 2012; Chen et al., 2007; Westerlund et Hoffman, 2004).

Juvenilní hormon je lipofilní látka a pro jeho extrakci se používají nepolární extrakční činidla jako je např. hexan nebo isooktan. Z dostupné literatury se ale pro použití metody LC-MS jeví lepší variantou použití extrakční směsi isooktan-methanol (Zhou et al., 2011, Chen et al., 2007). Směs isooktan-methanol je vhodná pro extrakci JH III z hemolymfy,

protože brání působení esterasy juvenilního hormonu, napomáhá v kombinaci s použitím ultrazvuku k uvolnění JH III z binding proteinu (JHBP) a snižuje adhezi JH III ke sklu. Navíc u čerstvě odebrané hemolymfy potlačuje aktivitu fenoloxidas (Westerlund et Hoffman, 2004). Extrakční směs isooktan-methanol byla tedy použita v této diplomové práci.

K extrakci JH III byly nejdříve použity celé včely, ale vzhledem k tomu že extrakce JH III z celé včely nebyla vyhovující, protože se po homogenizaci vzorku uvolňovalo velké množství lipidů, kvůli čemuž se směs špatně odpařovala v rotační vakuové odparce, a vedlo to k detekci nižších hladin JH III, zvolila se pro extrakci JH III včelí hemolymfa. JH III z celých včel, respektive larev, izolovali ve svém protokolu Zhou et al., (2011). Z odebrané hemolymfy včel, která byla smíchána s fenylthiomocovinou (PTU), kvůli potlačení fenoloxidasové aktivity, izolovali JH III extrakční směsí isooktan-methanol Ares et al. (2012). Z naměřených výsledků se ale jeví použití 0,1% kyseliny trifloroctové (TFA) v kombinaci s následnou lyofylizací vhodnější než odběr hemolymfy do PTU. Z hmyzí hemolymfy JH III izolovaly dále např. Chen et al. (2007), Westerlund et Hoffman (2004), Ares et al. (2012) a Ramirez et al. (2020).

Jak již bylo zmíněno, juvenilní hormon má sklon k adhezi ke sklu (Giese et al., 1977). Proto byly vyzkoušeny a porovnány experimenty s použitím LB silylovaných mikrozkuvek a vialek. Při použití LB silylovaných mikrozkuvek a LB silylovaných vialek bylo dosaženo lepších výsledků oproti plastovým mikrozkuvkám a skleněným vialkám, kdy docházelo ke zdatelně větším ztrátám JH III a IS v průběhu extrakce, což bylo možné sledovat na menší ploše píků jak pro IS tak JH III.

Porovnával se vliv extrakce na ztráty JH III a IS. V průběhu extrakce docházelo ke ztrátám jak IS methoprenu tak i JH III. Výťažnost metody byla v průměru pro IS  $55 \pm 7,5$  % a  $87 \pm 4,5$  % pro JH III.

Ke kvantifikaci JH III byla sestrojena externí kalibrační s methoprenem jako interním standardem. Další metodou pro kvantifikaci JH III ve vzorcích hemolymfy byla použita metoda standardního přídavku, kdy k neznámé koncentraci hemolymfy byl přidán IS methopren a různé přídavky JH III (1 pmol, 2,5 pmol a 5 pmol). Z naměřených dat byl sestrojen graf a vypočtena koncentrace JH III ve vzorcích hemolymfy která byla  $230,5 \pm 30,5$  pg. $\mu$ l<sup>-1</sup>. Ares et al. (2012) kvantifikovaly JH III ve včelí hemolymfě v rozmezí 77-166 pg. $\mu$ l<sup>-1</sup> a Zhou et al. (2011) 0,2 – 0,6 ng.g<sup>-1</sup> včelí larvy. Rozdílné hodnoty naměřeného JH III ve vzorcích hemolymfy včel jsou dány biologickou variabilitou vzorků.

Vyvinutou metodu je třeba dále optimalizovat, tak aby docházelo k minimálním ztrátám JH III a IS v průběhu izolace JH III z hemolymfy, případně vyzkoušet použití JH – D<sub>3</sub> jako interního standardu pro měření v MRM módu. Metoda byla částečně validována – byla ověřena selektivita a specifita metody, byla sestrojena kalibrační křivka pro kvantifikaci vzorku a stanovena výtěžnost metody. V budoucnu je třeba dokončit validaci tj., stanovit limit detekce a kvantifikace, přesnost a preciznost metody, minimalizovat vliv matricových efektů, přenos a změřit stabilitu. Dále je pak třeba metodu verifikovat, aby mohla být použitelná pro další studium juvenilního hormonu a jeho vlivu na dlouhověkost včel.

## 6 Závěr

Diplomová práce je věnována vývoji metody pro detekci a kvantifikaci hmyzích hormonů s hlavním zaměřením na juvenilní hormon a jeho funkce u včely medonosné (*Apis mellifera*). V teoretické části je zpracována literární rešerše zabývající se přehledem poznatků o endokrinní soustavě hmyzu a hmyzích hormonech, se zaměřením na ekdysteroidy, juvenilní hormony a neuropeptidické hormony, a metodách detekce jednotlivých hormonů. Dále je zde zpracována kapitola o vývoji metody pro detekci a kvantifikaci juvenilního hormonu III. V praktické části se optimalizovala metoda UHPLC-ESI-QTOF pro detekci a kvantifikaci juvenilního hormonu III.

Byla změřena MS spektra pro juvenilní hormon. Hodnoty  $m/z$  odpovídaly předem vypočteným hodnotám  $m/z$  v programu Compass Isotope Pattern. Nejvyšší zastoupení měl fragment o  $m/z$  235,17. Dále byly zaznamenány píky pro protonizovaný JH III ( $m/z$  267,19), adukt JH III s amoniakem ( $m/z$  284,22) a další fragmenty o  $m/z$  147, 11; 189,12 a 217, 15, na které se JH III rozpadal.

Optimalizovala se metoda kapalinové chromatografie. Bylo testováno celkem pět chromatografických kolon:  $C_{18}$  UHPLC kolona Kinetex ( $150 \times 2,1$  mm), Kinetex Phenyl – Hexyl kolona ( $150 \times 2,1$  mm), Arion Astra  $C_{18}$  – He kolona ( $150 \times 2,1$  mm), Arion  $C_8$  HPLC kolona ( $150 \times 2,1$  mm) a  $C_{18}$  Arion Polar® kolona ( $150 \times 2,1$  mm). Nejlepší tvar, intenzitu a plochu píku měl JH III při použití Arion  $C_8$  kolony, která byla dále použita pro analýzu. Byl optimalizován výběr mobilní fáze, přičemž byly testovány dvě mobilní fáze. Použití MF2 (A: voda +  $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$  AmFA + 0,1% FA; B: 90% acetonitril + 0,1% FA) vedlo ke zvětšení plochy píku oproti MF1 (A: voda + 0,5% FA; B: 90% AcN + 0,5% FA). MF2 byla zvolena jako mobilní fáze pro další měření.

Pro kvantifikaci JH III byl zvolen jako vnitřní standard methopren. Byla změřena MS spektra pro methopren, přičemž nejvyšší intenzitu měl pík pro fragment o  $m/z$  279,23. Tento fragment byl následně použit pro kvantifikaci JH III. Dalším dostupným interním standardem pro kvantifikaci JH III byl deuteriem značený juvenilní hormon (JH- $D_3$ ), pro který byly taktéž změřeny MS spektra. JH- $D_3$  se v průběhu ionizace rozpadal na neznačený fragment 235,17, což je nežádoucí, protože na stejný iont se rozpadá i JH III. Použití tohoto izotopově značeného standardu tedy není vhodné pro měření v jednoduchém MS módu.

Byla optimalizována metoda izolace juvenilního hormonu III z hemolymfy *Apis mellifera*. Jako extrakční činidlo byla zvolena směs isooktan-methanol. Extrakce se prováděla v LB silylovaných mikrozkuvkách a vialkách pro snížení adheze JH III k plastovým a skleněným materiálům. JH III se izoloval z včelí hemolymfy, protože extrakce JH III z celých včel nebyla optimální. Byl optimalizován odběr hemolymfy, kdy větší plochy píku pro IS a JH III bylo dosaženo odběrem hemolymfy do 0,1% kyseliny trifluoroctové oproti fenylthiomocovině. Výtěžnost pro plochy píku IS a JH III po extrakci byla v průměru  $55 \pm 7,5$  % pro IS a  $87 \pm 4,5$  % pro JH III.

Pro kvantifikaci JH III z včelí hemolymfy byla sestrojena externí kalibrační řada s methoprenem jako IS. Další metodou pro kvantifikaci JH III, která byla použita, byla metoda standardního přídatku. V odebraných vzorcích hemolymfy bylo kvantifikováno množství JH III. Průměrná hodnota JH III ve včelí hemolymfě byla  $230,5 \pm 30,5$  pg. $\mu$ l<sup>-1</sup>.

U vyvinuté metody je třeba dokončit validaci – stanovit limit detekce a kvantifikace, přesnost a preciznost metody, minimalizovat vliv matricových efektů, přenos a změřit stabilitu. Dále je pak třeba metodu verifikovat, aby mohla být použitelná pro další studium juvenilního hormonu a jeho vlivu na dlouhověkost včel.

## 7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Agui, N. (1989). In Vitro Release of Prothoracicotropic Hormone (PTTH) from the Brain of Mamestra Brassicae L: Effects of Neurotransmitter Substances on PTTH Release. *Invertebrate Cell System Applications*, (1), 111-119. <https://doi.org/10.1201/9781351073844-12>
- Amdam, G. V., Norberg, K., Hagen, A., & Omholt, S. W. (2003). Social exploitation of vitellogenin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(4), 1799-1802. <https://doi.org/10.1073/pnas.0333979100>
- Ares, A. M., Nozal, M. J., Bernal, J. L., Martín-Hernández, R., M.Higes, & Bernal, J. (2012). Liquid chromatography coupled to ion trap-tandem mass spectrometry to evaluate juvenile hormone III levels in bee hemolymph from Nosema spp. infected colonies. *Journal of Chromatography B*, 899, 146-153. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.05.016>
- Bai, J., Uehara, Y., & Montell, D. J. (2000). Regulation of Invasive Cell Behavior by Taiman, a Drosophila Protein Related to AIB1, a Steroid Receptor Coactivator Amplified in Breast Cancer. *Cell*, 103(7), 1047-1058. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00208-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00208-7)
- Bai, J., Uehara, Y., & Montell, D. J. (2000). Regulation of Invasive Cell Behavior by Taiman, a Drosophila Protein Related to AIB1, a Steroid Receptor Coactivator Amplified in Breast Cancer. *Cell*, 103(7), 1047-1058. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00208-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00208-7)
- Belles, X. (2020). Hormones involved in the regulation of metamorphosis. In *Insect Metamorphosis* (pp. 105-130). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813020-9.00006-5>
- Beydon, P., & Lafont, R. (1983). Feedback inhibition of ecdysone production by 20-hydroxyecdysone in Pieris brassicae pupae. *Journal of Insect Physiology*, 29(6), 529-533. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(83\)90084-7](https://doi.org/10.1016/0022-1910(83)90084-7)
- Bollenbacher, W. E., Vedeckis, W. V., Gilbert, L. I., & O'Connor, J. D. (1975). Ecdysone titers and prothoracic gland activity during the larval-pupal development of Manduca sexta. *Developmental Biology*, 44(1), 46-53. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(75\)90375-9](https://doi.org/10.1016/0012-1606(75)90375-9)
- Bownes, M. (1994). The regulation of the yolk protein genes, a family of sex differentiation genes in Drosophila melanogaster. *BioEssays*, 16(10), 745-752. <https://doi.org/10.1002/bies.950161009>
- Brown, B. E. (1977). Occurrence of proctolin in six orders of insects. *Journal of Insect Physiology*, 23(7), 861-864. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(77\)90011-7](https://doi.org/10.1016/0022-1910(77)90011-7)
- Butenandt, A., & Karlson, P. (1954). Über die Isolierung eines Metamorphose-Hormons der Insekten in kristallisierter Form. *Zeitschrift für Naturforschung B*, 9(6), 389-391. <https://doi.org/10.1515/znb-1954-0601>
- COOK, B. E. N. J. A. M. I. N. J., & MEOLA, S. H. I. R. L. E. E. (1978). The oviduct musculature of the horsefly, Tabanus sulcifrons, and its response to 5-hydroxytryptamine and proctolin. *Physiological Entomology*, 3(4), 273-280. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.1978.tb00159.x>
- Corona, M., Velarde, R. A., Remolina, S., Moran-Lauter, A., Wang, Y., Hughes, K. A., & Robinson, G. E. (2007). Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signaling, and queen honey bee longevity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(17), 7128-7133. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701909104>
- Dadgar, D., & Burnett, P. E. (1995). Issues in evaluation of bioanalytical method selectivity and drug stability. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 14(1-2), 23-31. [https://doi.org/10.1016/0731-7085\(95\)01634-1](https://doi.org/10.1016/0731-7085(95)01634-1)
- Danihlík, J., Aronstein, K., & Petřiválský, M. (2016). Antimicrobial peptides: a key component of honey bee innate immunity. *Journal of Apicultural Research*, 54(2), 123-136. <https://doi.org/10.1080/00218839.2015.1109919>
- Denlinger, D. L., Yocum, G. D., & Rinehart, J. P. (2012). Hormonal Control of Diapause. In *Insect Endocrinology* (pp. 430-463). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384749-2.10010-X>
- Diederer, J. H. B., Oudejans, R. C. H. M., Harthoorn, L. F., & Van Der Horst, D. J. (2002). Cell biology of the adipokinetic hormone-producing neurosecretory cells in the locust corpus cardiacum. *Microscopy Research and Technique*, 56(3), 227-236. <https://doi.org/10.1002/jemt.10026>

- Dorn, A., & Romer, F. (1976). Structure and function of prothoracic glands and oenocytes in embryos and last larval instars of *Oncopeltus fasciatus* Dallas (Insecta, Heteroptera). *Cell and Tissue Research*, 171(3). <https://doi.org/10.1007/BF00224658>
- Dostálková, S., Dobeš, P., Kunc, M., Hurychová, J., Škrabišová, M., Petřivalský, M., Titěra, D., Havlík, J., Hyršl, P., & Danihlík, J. (2021). Winter honeybee (*Apis mellifera*) populations show greater potential to induce immune response than summer ones after immune stimuli. *Journal of Experimental Biology*, 224(3). <https://doi.org/10.1242/jeb.232595>
- Erley, D., Southard, S., & Emmerich, H. (1975). Excretion of juvenile hormone and its metabolites in the locust, *Locusta migratoria*. *Journal of Insect Physiology*, 21(1), 61-70. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(75\)90068-2](https://doi.org/10.1016/0022-1910(75)90068-2)
- Farooqui, T. (2012). Review of octopamine in insect nervous systems. *Open Access Insect Physiology*, 4, 1-12. <https://doi.org/10.2147/OAIP.S20911>
- Fluri, P., Lüscher, M., Wille, H., & Gerig, L. (1982). Changes in weight of the pharyngeal gland and haemolymph titres of juvenile hormone, protein and vitellogenin in worker honey bees. *Journal of Insect Physiology*, 28(1), 61-68. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(82\)90023-3](https://doi.org/10.1016/0022-1910(82)90023-3)
- Fluri, P., Wille, H., Gerig, L., & Lüscher, M. (1977). Juvenile hormone, vitellogenin and haemocyte composition in winter worker honeybees (*Apis mellifera*). *Experientia*, 33(9), 1240-1241. <https://doi.org/10.1007/BF01922354>
- Fournier, B., Guérineau, N., Mollard, P., & Girardie, J. (1994). Effects of two neuronal antidiuretic molecules, neuropeptin and 5-hydroxytryptamine, on cytosolic free calcium monitored with indo-1 in epithelial and muscular cells of the African locust rectum. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1220(2), 181-187. [https://doi.org/10.1016/0167-4889\(94\)90133-3](https://doi.org/10.1016/0167-4889(94)90133-3)
- Fruttero, L. L., Leyria, J., & Canavoso, L. E. (2017). Lipids in Insect Oocytes: From the Storage Pathways to Their Multiple Functions. In M. Kloc (Ed.), *Oocytes* (pp. 403-434). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-60855-6\\_18](https://doi.org/10.1007/978-3-319-60855-6_18)
- Fukuda, H., & Sekiguchi, K. (1966). Seasonal change of the honeybee worker longevity in Sapporo, North Japan, with notes on some factors affecting the life span. *Japanese journal of Ecology*, 16(5), 206-219. [https://doi.org/10.18960/seitai.16.5\\_206](https://doi.org/10.18960/seitai.16.5_206)
- FUKUDA, S. (1940). Induction of Pupation in Silkworm by Transplanting the Prothoracic Gland. *Proceedings of the Imperial Academy*, 16(8), 414-416. <https://doi.org/10.2183/pjab1912.16.414>
- Gäde, G., & Auerswald, L. (2003). Mode of action of neuropeptides from the adipokinetic hormone family. *General and Comparative Endocrinology*, 132(1), 10-20. [https://doi.org/10.1016/S0016-6480\(03\)00159-X](https://doi.org/10.1016/S0016-6480(03)00159-X)
- Giese, C., Spindler, K. D., & Emmerich, H. (1977). The Solubility of Insect Juvenile Hormone in Aqueous Solutions and Its Adsorption by Glassware and Plastics. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 32(3-4), 158-160. <https://doi.org/10.1515/znc-1977-3-403>
- Gilbert, L. I., A. Granger, N., & Roe, R. M. (2000). The juvenile hormones: historical facts and speculations on future research directions. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30(8-9), 617-644. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(00\)00034-5](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(00)00034-5)
- Gilbert, L. I., Rybczynski, R., & Warren, J. T. (2002). Control and Biochemical Nature of the Ecdysteroidogenic Pathway. *Annual Review of Entomology*, 47(1), 883-916. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.47.091201.145302>
- Gilbert, L. I., Song, Q., & Rybczynski, R. (1997). Control of ecdysteroidogenesis: Activation and inhibition of prothoracic gland activity. *Invertebrate Neuroscience*, 3(2-3), 205-216. <https://doi.org/10.1007/BF02480376>
- GILBERT, L. I., BOLLENBACHER, W. E., GOODMAN, W., SMITH, S. L., AGUI, N., GRANGER, N., & SEDLAK, B. J. (1980). Hormones Controlling Insect Metamorphosis. In *Proceedings of the 1979 Laurentian Hormone Conference* (pp. 401-449). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-571136-4.50017-6>
- GILLOTT, C. E. D. R. I. C., & ISMAIL, P. R. E. E. T. I. M. (1995). In vitro synthesis of ecdysteroid by the male accessory reproductive glands, testis and abdominal integument of the adult migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. *Invertebrate Reproduction & Development*, 27(1), 65-71. <https://doi.org/10.1080/07924259.1995.9672435>



- Grieneisen, M. L., Kieckbusch, T. D., Mok, A., Dorman, G., Latli, B., Prestwich, G. D., & Schooley, D. A. (1995). Characterization of the juvenile hormone epoxide hydrolase (JHEH) and juvenile hormone diol phosphotransferase (JHDPT) from *Manduca sexta* Malpighian tubules. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, *30*(2-3), 255-270. <https://doi.org/10.1002/arch.940300213>
- Guidugli, K. R., Piulachs, M. -D., Bellés, X., Lourenço, A. P., & Simões, Z. L. P. (2005). Vitellogenin expression in queen ovaries and in larvae of both sexes of *Apis mellifera*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, *59*(4), 211-218. <https://doi.org/10.1002/arch.20061>
- Guo, W., Wu, Z., Song, J., Jiang, F., Wang, Z., Deng, S., Walker, V. K., Zhou, S., & Palli, S. R. (2014). Juvenile Hormone-Receptor Complex Acts on Mcm4 and Mcm7 to Promote Polyploidy and Vitellogenesis in the Migratory Locust. *PLoS Genetics*, *10*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004702>
- Hagedorn, H. H., & Kunkel, J. G. (1979). Vitellogenin and Vitellin in Insects. *Annual Review of Entomology*, *24*(1), 475-505. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.24.010179.002355>
- Hagedorn, H. H., O'Connor, J. D., Fuchs, M. S., Sage, B., Schlaeger, D. A., & Bohm, M. K. (1975). The ovary as a source of alpha-ecdysone in an adult mosquito. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *72*(8), 3255-3259. <https://doi.org/10.1073/pnas.72.8.3255>
- Henrich VC, Vogtli ME, Antoniewski C, Spindler-Barth M, Przibilla S, Nouredine M, & Lezzi M. (2000). Developmental effects of a chimeric ultraspiracle gene derived from *Drosophila* and *Chironomus*. *Genesis*, *28*(3-4), 125-133. doi: 10.1002/1526-968x(200011/12)28:3/4<125::aid-gene50>3.3.co;2-j. PMID: 11105053.
- Henrich, V. C. (2012). The Ecdysteroid Receptor. In *Insect Endocrinology* (pp. 177-218). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384749-2.10005-6>
- Hiruma, K., & Riddiford, L. M. (2010). Developmental expression of mRNAs for epidermal and fat body proteins and hormonally regulated transcription factors in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Journal of Insect Physiology*, *56*(10), 1390-1395. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2010.03.029>
- Huang, Z. -Y., Robinson, G. E., Tobe, S. S., Yagi, K. J., Strambi, C., Strambi, A., & Stay, B. (1991). Hormonal regulation of behavioural development in the honey bee is based on changes in the rate of juvenile hormone biosynthesis. *Journal of Insect Physiology*, *37*(10), 733-741. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(91\)90107-B](https://doi.org/10.1016/0022-1910(91)90107-B)
- Huber, R., & Hoppe, W. (1965). Zur Chemie des Ecdysons, VII: Die Kristall- und Molekülstrukturanalyse des Insektenverpuppungshormons Ecdyson mit der automatisierten Faltmolekülmethode. *Chemische Berichte*, *98*(7), 2403-2424. <https://doi.org/10.1002/cber.19650980744>
- Chanchay, P., Vongsangnak, W., Thancharoen, A., & Sriboonlert, A. (2019). Reconstruction of insect hormone pathways in an aquatic firefly, *Sclerotia aquatilis* (Coleoptera: Lampyridae), using RNA-seq. *PeerJ*, *7*. <https://doi.org/10.7717/peerj.7428>
- Charles, J. -P., Iwema, T., Epa, V. C., Takaki, K., Rynes, J., & Jindra, M. (2011). Ligand-binding properties of a juvenile hormone receptor, Methoprene-tolerant. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(52), 21128-21133. <https://doi.org/10.1073/pnas.1116123109>
- Chen, Z., Linse, K. D., Taub-Montemayor, T. E., & Rankin, M. A. (2007). Comparison of radioimmunoassay and liquid chromatography tandem mass spectrometry for determination of juvenile hormone titers. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *37*(8), 799-807. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2007.05.019>
- Jaycox, E. R. (1976). Behavioral Changes in Worker Honey Bees (*Apis mellifera* L.) after Injection with Synthetic Juvenile Hormone (Hymenoptera: Apidae). *Journal of the Kansas Entomological Society*, *49*(2), 167-170.
- Jaycox, E. R., Skowronek, W., & Guynn, G. (1974). Behavioral Changes in Worker Honey Bees (*Apis mellifera*) Induced by Injections of a Juvenile Hormone Mimic1. *Annals of the Entomological Society of America*, *67*(4), 529-534. <https://doi.org/10.1093/aesa/67.4.529>
- Jenkins, R., Duggan, J. X., Aubry, A. -F., Zeng, J., Lee, J. W., Cojocar, L., Dufield, D., Garofolo, F., Kaur, S., Schultz, G. A., Xu, K., Yang, Z., Yu, J., Zhang, Y. J., & Vazvaei, F. (2015). Recommendations for Validation of LC-MS/MS Bioanalytical Methods for Protein Biotherapeutics. *The AAPS Journal*, *17*(1), 1-16. <https://doi.org/10.1208/s12248-014-9685-5>

- Jindra, M., Bellés, X., & Shinoda, T. (2015). Molecular basis of juvenile hormone signaling. *Current Opinion in Insect Science*, *11*, 39-46. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.08.004>
- Jindra, M., Tumova, S., Milacek, M., & Bittova, L. (2021). A decade with the juvenile hormone receptor. *Genes and Endocrine Signaling in Development and Homeostasis*, 37-85. <https://doi.org/10.1016/bs.aiip.2021.03.001>
- Jindra, M., Uhlířová, M., Charles, J. -P., Smykal, V., Hill, R. J., & Yamanaka, N. (2015). Genetic Evidence for Function of the bHLH-PAS Protein Gce/Met As a Juvenile Hormone Receptor. *PLOS Genetics*, *11*(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005394>
- Jones, G., Jones, D., Teal, P., Sapa, A., & Wozniak, M. (2006). The retinoid-X receptor ortholog, ultraspiracle, binds with nanomolar affinity to an endogenous morphogenetic ligand. *The FEBS Journal*, *273*(21), 4983-4996. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05498.x>
- Kannangara, J. R., Mirth, C. K., & Warr, C. G. (2021). Regulation of ecdysone production in *Drosophila* by neuropeptides and peptide hormones. *Open Biology*, *11*(2). <https://doi.org/10.1098/rsob.200373>
- Kataoka, H., Toschi, A., Li, J. P., Carney, R. L., Schooley, D. A., & Kramer, S. J. (1989). Identification of an Allatotropin from Adult *Manduca sexta*. *Science*, *243*(4897), 1481-1483. <https://doi.org/10.1126/science.243.4897.1481>
- Kataoka, H., Toschi, A., Li, J. P., Carney, R. L., Schooley, D. A., & Kramer, S. J. (1989). Identification of an Allatotropin from Adult *Manduca sexta*. *Science*, *243*(4897), 1481-1483. <https://doi.org/10.1126/science.243.4897.1481>
- Klowden, M. J. (2008). *Physiological Systems in Insects* (2nd ed.). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-369493-5.X5001-9>
- Knoll, S., Pinna, W., Varcasia, A., Scala, A., & Cappai, M. G. (2020). The honey bee (*Apis mellifera* L., 1758) and the seasonal adaptation of productions. Highlights on summer to winter transition and back to summer metabolic activity. A review. *Livestock Science*, *235*. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2020.104011>
- KODRÍK, D. A. L. I. B. O. R. (2008). Adipokinetic hormone functions that are not associated with insect flight. *Physiological Entomology*, *33*(3), 171-180. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.2008.00625.x>
- Koelle, M. R., Talbot, W. S., Segraves, W. A., Bender, M. T., Cherbas, P., & Hogness, D. S. (1991). The *Drosophila* EcR gene encodes an ecdysone receptor, a new member of the steroid receptor superfamily. *Cell*, *67*(1), 59-77. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90572-G](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90572-G)
- Kolodziejczyk, R., Bujacz, G., Jakób, M., Ożyhar, A., Jaskolski, M., & Kochman, M. (2008). Insect Juvenile Hormone Binding Protein Shows Ancestral Fold Present in Human Lipid-Binding Proteins. *Journal of Molecular Biology*, *377*(3), 870-881. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.01.026>
- Konopova, B., & Jindra, M. (2007). Juvenile hormone resistance gene Methoprene-tolerant controls entry into metamorphosis in the beetle *Tribolium castaneum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(25), 10488-10493. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703719104>
- Kunc, M., Dobeš, P., Hurychová, J., Vojtek, L., Poiani, S. B., Danihlík, J., Havlík, J., Titěra, D., & Hyršl, P. (2019). The Year of the Honey Bee (*Apis mellifera* L.) with Respect to Its Physiology and Immunity: A Search for Biochemical Markers of Longevity. *Insects*, *10*(8). <https://doi.org/10.3390/insects10080244>
- Kurzchalia, T. V., & Ward, S. (2003). Why do worms need cholesterol? *Nature Cell Biology*, *5*(8), 684-688. <https://doi.org/10.1038/ncb0803-684>
- Lafont, R., Balducci, C., & Dinan, L. (2021). Ecdysteroids. *Encyclopedia*, *1*(4), 1267-1302. <https://doi.org/10.3390/encyclopedia1040096>
- Lafont, R., Dauphin-Villemant, C., Warren, J. T., & Rees, H. (2012). Ecdysteroid Chemistry and Biochemistry. In *Insect Endocrinology* (pp. 106-176). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384749-2.10004-4>
- Lagueux, M., Hirn, M., & Hoffmann, J. A. (1977). Ecdysone during ovarian development in *Locusta migratoria*. *Journal of Insect Physiology*, *23*(1), 109-119. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(77\)90116-0](https://doi.org/10.1016/0022-1910(77)90116-0)

- Lange, A. B. (2009). Tyramine: From octopamine precursor to neuroactive chemical in insects. *General and Comparative Endocrinology*, 162(1), 18-26. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2008.05.021>
- Li, M., Liu, P., Wiley, J. D., Ojani, R., Bevan, D. R., Li, J., & Zhu, J. (2014). A steroid receptor coactivator acts as the DNA-binding partner of the methoprene-tolerant protein in regulating juvenile hormone response genes. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 394(1-2), 47-58. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2014.06.021>
- Liu, P., Peng, H. -J., & Zhu, J. (2015). Juvenile hormone-activated phospholipase C pathway enhances transcriptional activation by the methoprene-tolerant protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(15). <https://doi.org/10.1073/pnas.1423204112>
- Liu, X., Tanaka, Y., Song, Q., Xu, B., & Hua, Y. (2004). Bombyx mori prothoracicostatic peptide inhibits ecdysteroidogenesis in vivo. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 56(4), 155-161. <https://doi.org/10.1002/arch.20005>
- Lourenço, A. P., Martins, J. R., Torres, F. A. S., Mackert, A., Aguiar, L. R., Hartfelder, K., Bitondi, M. M. G., & Simões, Z. L. P. (2019). Immunosenescence in honey bees (*Apis mellifera* L.) is caused by intrinsic senescence and behavioral physiology. *Experimental Gerontology*, 119, 174-183. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2019.02.005>
- Mackert, A., do Nascimento, A. M., Bitondi, M. M. G., Hartfelder, K., & Simões, Z. L. P. (2008). Identification of a juvenile hormone esterase-like gene in the honey bee, *Apis mellifera* L. — Expression analysis and functional assays. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 150(1), 33-44. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2008.01.004>
- mauchamp, B., Couillaud, F., & Malosse, C. (1985). Gas chromatography-mass spectroscopy analysis of juvenile hormone released by insect corpora allata. *Analytical Biochemistry*, 145(2), 251-256. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90358-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90358-6)
- MILLER, T. H. O. M. A. S. (1979). Nervous Versus Neurohormonal Control of Insect Heartbeat. *American Zoologist*, 19(1), 77-86. <https://doi.org/10.1093/icb/19.1.77>
- Minakuchi, C., Namiki, T., & Shinoda, T. (2009). Krüppel homolog 1, an early juvenile hormone-response gene downstream of Methoprene-tolerant, mediates its anti-metamorphic action in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Developmental Biology*, 325(2), 341-350. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.10.016>
- Mukai, A., Mano, G., Des Marteaux, L., Shinada, T., & Goto, S. G. (2022). Juvenile hormone as a causal factor for maternal regulation of diapause in a wasp. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 144. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2022.103758>
- NAGATA, S. H. I. N. J. I., KATAOKA, H. I. R. O. S. H. I., & SUZUKI, A. I. N. O. R. I. (2005). Silk Moth Neuropeptide Hormones: Prothoracicotropic Hormone and Others. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1040(1), 38-52. <https://doi.org/10.1196/annals.1327.004>
- Nigg, H. N., Svoboda, J. A., Thompson, M. J., Kaplanis, J. N., Dutky, S. R., & Robbins, W. E. (1974). Ecdysone metabolism: Ecdysone dehydrogenase-isomerase. *Lipids*, 9(12), 971-974. <https://doi.org/10.1007/BF02533820>
- NIJHOUT, H. F. R. E. D. E. R. I. K. (1998). *Insect Hormones*. Princeton University Press. <https://doi.org/10.2307/j.ctv19fvz3n>
- Niwa, R., & Niwa, Y. S. (2014). Enzymes for ecdysteroid biosynthesis: their biological functions in insects and beyond. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 78(8), 1283-1292. <https://doi.org/10.1080/09168451.2014.942250>
- Noriega, F. G. (2014). Juvenile Hormone Biosynthesis in Insects: What Is New, What Do We Know, and What Questions Remain? *International Scholarly Research Notices*, 2014, 1-16. <https://doi.org/10.1155/2014/967361>
- Okamoto, N., Viswanatha, R., Bittar, R., Li, Z., Haga-Yamanaka, S., Perrimon, N., & Yamanaka, N. (2018). A Membrane Transporter Is Required for Steroid Hormone Uptake in *Drosophila*. *Developmental Cell*, 47(3), 294-305.e7. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.09.012>
- Orchard, I., & Lange, A. B. (2024). The neuroendocrine and endocrine systems in insect – Historical perspective and overview. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 580. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2023.112108>

- Oro, A. E., Mckeown, M., & Evans, R. M. (1992). The *Drosophila* retinoid X receptor homolog ultraspiracle functions in both female reproduction and eye morphogenesis. *Development*, *115*(2), 449-462. <https://doi.org/10.1242/dev.115.2.449>
- Page, R. E., & Robinson, G. E. (1991). The Genetics of Division of Labour in Honey Bee Colonies. In *Advances in Insect Physiology Volume 23* (pp. 117-169). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0065-2806\(08\)60093-4](https://doi.org/10.1016/S0065-2806(08)60093-4)
- Phillips, J. (1981). Comparative physiology of insect renal function. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *241*(5), R241-R257. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1981.241.5.R241>
- Pinto, L. Z., Bitondi, M. M. G., & Simões, Z. L. P. (2000). Inhibition of vitellogenin synthesis in *Apis mellifera* workers by a juvenile hormone analogue, pyriproxyfen. *Journal of Insect Physiology*, *46*(2), 153-160. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(99\)00111-0](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(99)00111-0)
- Raabe, M. (1982). *Insect Neurohormones*. Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-4684-4013-3>
- Racek, J., , et al., & . (2021). *Klinická biochemie* (Třetí, přepracované a rozšířené vydání). Galén.
- Raikhel, A. S., & Dhadialla, T. S. (1992). Accumulation of Yolk Proteins in Insect Oocytes. *Annual Review of Entomology*, *37*(1), 217-251. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.37.010192.001245>
- Ramirez, C. E., Nouzova, M., Benigni, P., Quirke, J. M. E., Noriega, F. G., & Fernandez-Lima, F. (2016). Fast, ultra-trace detection of juvenile hormone III from mosquitoes using mass spectrometry. *Talanta*, *159*, 371-378. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.06.041>
- Ramirez, C. E., Nouzova, M., Michalkova, V., Fernandez-Lima, F., & Noriega, F. G. (2020). Common structural features facilitate the simultaneous identification and quantification of the five most common juvenile hormones by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *116*. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2019.103287>
- Ribbands, C. R. (1952). Division of labour in the honeybee community. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B - Biological Sciences*, *140*(898), 32-43. <https://doi.org/10.1098/rspb.1952.0041>
- Riddiford, L. M. (2012). How does juvenile hormone control insect metamorphosis and reproduction? *General and Comparative Endocrinology*, *179*(3), 477-484. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2012.06.001>
- Riddiford, L. M. (1978). Ecdysone-induced change in cellular commitment of the epidermis of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, at the initiation of metamorphosis. *General and Comparative Endocrinology*, *34*(4), 438-446. [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(78\)90284-8](https://doi.org/10.1016/0016-6480(78)90284-8)
- RIDDIFORD, L. Y. N. N. M., & TRUMAN, J. A. M. E. S. W. (1993). Hormone Receptors and the Regulation of Insect Metamorphosis. *American Zoologist*, *33*(3), 340-347. <https://doi.org/10.1093/icb/33.3.340>
- Richter, K., Peschke, E., & Peschke, D. (2000). A neuroendocrine releasing effect of melatonin in the brain of an insect, *Periplaneta americana* (L.). *Journal of Pineal Research*, *28*(3), 129-135. <https://doi.org/10.1034/j.1600-079X.2001.280301.x>
- Robinson, G. E., Page, R. E., Strambi, C., & Strambi, A. (1992). Colony Integration in Honey Bees: Mechanisms of Behavioral Reversion. *Ethology*, *90*(4), 336-348. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.1992.tb00844.x>

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

20E	20-hydroxyekdyson
AcN	acetonitril
AKH	adipokinetický hormon
AmFA	mravenčan amonný
CA	<i>corpora allata</i>
CC	<i>corpora cardiaca</i>
EcR	ekdysonový receptor
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
EMA	European Medicine Agency
FA	kyselina mravenčí
FDA	US Food and Drug Administration for Industry
GC	plynová chromatografie
Gce	germ cell exprimed receptor
IS	interní standard (vnitřní standard)
JH	juvenilní hormon
JHBP	juvenile hormone binding protein
JH-D <sub>3</sub>	deuteriem značený juvenilní hormon III
JHDK	kinasa diolu juvenilního hormonu
JHE	esterasa juvenilního hormonu
JHEH	epoxyhydrolasa juvenilního hormonu
Krh-1	Krüppelův homolog
LB	limit blanku
LLOQ	limit kvantifikace
LOD	limit detekce
Met	methopren tolerantní protein
MRM	multiple reaction monitoring
PG	prothorakální žláza
PTTH	prothoracikotropní hormon
PTU	fenylthiomočovina
RSD	směrodatná odchylka
SIM	single ion monitoring

TFA kyselina trifluoroctová  
UHPLC-ESI-QTOF vysokoúčinná kapalinová chromatografie s ionizací  
elektrosprejem a analyzátozem doby letu  
ULOQ horní limit kvantifikace  
USP ultraspiracle protein  
Vg vitellogenin