UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Vývoj LC-MS metody pro stanovení biogenních aminů v tkáních včely medonosné

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	**Bc. Jakub Rozhon**
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Jiří Danihlík, Ph.D.
Konzultant práce:	Mgr. Silvie Dostálková, Mgr. Jana Jemelková
Rok:	2023

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

V Olomouci dne .....

PODĚKOVÁNÍ

Touto cestou bych rád poděkoval Mgr. Janě Jemelkové a Mgr. Jiřímu Danihlíkovi, Ph.D. za odborné vedení, rady, trpělivost, vždy vstřícný přístup a překonání všech nezdarů při řešení experimentu a samotné kompletaci mé diplomové práce. V neposlední řadě bych také rád vyjádřil velké poděkování mé nejbližší rodině a Anně Žákové za důvěru a nekonečnou podporu.

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora: Bc. Jakub Rozhon

Název práce: Vývoj LC-MS metody pro stanovení biogenních aminů v tkáních včely medonosné

Typ práce: Diplomová

Pracoviště: Katedra biochemie

Vedoucí práce: Mgr. Jiří Danihlík, Ph.D.

Konzultant práce: Mgr. Jana Jemelková, Mgr. Silvie Dostálková

Rok obhajoby práce: 2023

Abstrakt

Celosvětově dochází ke znatelnému snižování populací včely medonosné (*Apis mellifera*), což je velký problém z hlediska zachování stability rostlinného a živočišného ekosystému a pěstování zemědělských plodin. Bazické biogenní aminy (BAs) dopamin, oktopamin a histamin zprostředkovávají jako neuromodulátory a neurotransmitery řadu biochemických procesů spojených s vnímáním jedince a jeho reakcemi na stresové podmínky, což se projevuje odlišnými reakcemi na základě jeho biologických potřeb. Reakcemi jedince na okolní vjemy jsou ovlivněny intenzita jeho pohybu, preference teploty a s ní spojený vývoj jedince, sociální interakce v rámci společenství sociálního hmyzu a chování spojené s krmením a obrannou, či imunitní reakcí jedince. Tato práce je věnována tvorbě metody pro extrakci, separaci a kvantifikaci dopaminu, oktopaminu a histaminu z vybraných částí těla včely medonosné. Výstupem experimentální části práce je optimalizovaný protokol zpracování různých tkání včely medonosné založený na extrakci vzorků hlavy, trávicího traktu, jedové žlázy a jedu v 90% acetonitrilu s 0,01% kyselinou mravenčí, na který navazuje derivatizace pomocí benzoylchloridu a analýza založená na metodě vysokoúčinné kapalinové chromatografie v reverzní fázi kombinované s tandemovou hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS/MS). Uvedeným způsobem byly kvantifikovány BAs dopamin, oktopamin a histamin v hlavě a trávicím traktu včel z včelstev infestovaných kleštíkem včelím (*Varroa destructor*), nebo ošetřených herbicidem paraquat (PQ). Dále byly uvedené BAs kvantifikovány v jedové žláze, či jedu zdravých včel. Látková množství BAs byla postupně určena v jedné hlavě,

nebo trávicím traktu včel trpících varoózou na 1,17 ± 0,52 nmol a 4,57 ± 0,38 nmol (dopamin), 27,22 ± 0,29 nmol (oktopamin, pouze trávicí trakt), poté 2,69 ± 0,14 nmol a 114,47 ± 8,63 nmol (histamin). V jedné hlavě, či trávicím traktu včel ošetřených PQ (*per os*) bylo stanoveno látkové množství vybraných BAs na 0,07 ± 0,04 nmol (dopamin, pouze trávicí trakt), dále 1,06 ± 0,21 nmol a 2,85 ± 0,66 nmol (histamin). V jedné jedové žláze zdravých včel, nebo v 1 g jejich lyofilizovaného jedu o různých koncentracích bylo naměřeno 8,74 ± 4,22 nmol a 24,05 ± 3,56 nmol.g^{-1} dopaminu, poté 21,33 ± 3,55 nmol a 158,67 ± 7,60 nmol.g^{-1} histaminu. Látková množství dopaminu ve vzorcích hlavy včel ošetřených PQ nebyla na měřitelné hladině. Optimalizovaná metoda je funkční pro stanovení dopaminu a histaminu. Detekce oktopaminu je problematická a bude nejspíše potřeba provést další optimalizační kroky chromatografické separace či hmotnostně spektrometrické analýzy. Takto upravená metoda přispěje po její validaci a uvedení do laboratorní praxe k výzkumu obranných reakcí včel či dalšího hmyzu.

Klíčová slova: Včela medonosná, LC-MS, biogenní aminy, dopamin, oktopamin, histamin, optimalizace, extrakce, separace, kvantifikace.

Počet stran: 109

Počet příloh: 59

Jazyk: Český

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Autor's first name and surname: Bc. Jakub Rozhon

Title: Development of LC-MS techniques for biogenic amines detection in honeybee´s tissues

Type of thesis: Diploma

Department: Department of biochemistry

Supervisor: Mgr. Jiří Danihlík, Ph.D.

Consultant: Mgr. Jana Jemelková, Mgr. Silvie Dostálková

The year of presentation: 2023

Abstract

The worldwide number of honeybee´s (*Apis mellifera*) populations is noticeably decreasing, which creates a big problem in case of plant and animal ecosystem stability and agricultural crops cultivation. Basic biogenic amines (BAs) dopamine, octopamine and histamine act in ivertebrates as neuromodulators and neurotransmitters – they mediate a number of biochemical pathways connected with senses of invertebrates and their reactions to stress conditions which are displayed in different reactions in favour of individuals biological needs. Individual´s reactions to external stimuli affect its intensity of locomotory activity, temperature preference connected with its body evolution, social interactions in case of social insect and behaviour connected with individual´s feeding, defensive, or immune reaction. The aim of this thesis is to create methods for extraction, separation and quantification of dopamine, octopamine and histamine from different honeybee´s body parts. Thesis experimental part contains optimised protocol of processing different honeybee´s body parts based on head, digestive tract, venomous gland and venom extraction in 90% acetonitrile with addition of 0,01% formic acid, which is followed by derivatisation via benzyolchloride and analysis based on high performance liquid chromatography in reverse phase combined with tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). Thereby were quantified BAs dopamine, octopamine and histamine in head and digestive tract of honeybees infested with *Varroa destructor* parasite or treated with paraquat (PQ) herbicide. Listed BAs were further quantified in venomous gland or venom from healthy bees. BAs amounts were determined in one head

or digestive tract of bees suffering from varroosis to 1,17 ± 0,52 nmol and 4,57 ± 0,38 nmol (dopamine), 27,22 ± 0,29 nmol (octopamine, digestive tract only), then 2,69 ± 0,14 nmol and 114,47 ± 8,63 nmol (histamine). In one head or digestive tract of bees treated with PQ (*per os*) the amount of BAs was set to 0,07 ± 0,04 nmol (dopamine, digestive tract only), then 1,06 ± 0,21 nmol and 2,85 ± 0,66 nmol (histamine). In one venomous gland or in 1 g of freeze-dried venom (different concentrations) of healthy honeybees it was determined 8,74 ± 4,22 nmol and 24,05 ± 3,56 $nmol.g^{-1}$ of dopamine, then 821,33 ± 3,55 nmol and 158,67 ± 7,60 $nmol.g^{-1}$ of histamine. Dopamine amount in samples of bees treated with PQ was under the measurable level. The optimised method works for dopamine and histamine determination. Detection of octopamine is problematic and so it is essential to perform next optimisation steps of chromatographic separation and mass spectrometric analysis. Thereby optimised method will after its validation and introduction to laboratory practise contribute to research on defensive reactions of honeybees or other insect.

Keywords: Honeybee, immunity, LC-MS, biogenic amines, dopamine, octopamine, histamine, optimalisation, extraction, separation, quantification.

Number of pages: 109

Number of appendices: 59

Language: Czech

1 OBSAH

1 OBSAH 8

2 CÍLE 10

3 ÚVOD 11

4 LITERÁRNÍ REŠERŠE 12

4.1 ANATOMIE HMYZÍHO MOZKU 12

4.2 BIOGENNÍ AMINY (BAS) 14

4.2.1 Struktura receptorů BAs a jejich signální dráhy 17

4.2.2 Dopamin 20

4.2.2.1 Dopaminové receptory 21

4.2.2.2 Funkce dopaminu v těle hmyzu 22

4.2.3 Oktopamin 27

4.2.3.1 Oktopaminové receptory 27

4.2.3.2 Funkce oktopaminu v těle hmyzu 29

4.2.4 Histamin 30

4.2.4.1 Histaminové receptory 31

4.2.4.2 Funkce histaminu v těle hmyzu 32

4.3 METABOLISMUS BAS V TĚLE HMYZU 33

4.3.1 Dopamin 33

4.3.2 Oktopamin 35

4.3.3 Histamin 37

4.4 VÝVOJ A POHLED NA METODY STANOVENÍ BAS 39

4.4.1 Extrakce z biologického vzorku 39

4.4.2 Derivatizace vzorku 40

4.4.3 Separační metody 45

4.4.4 Detekční a kvantifikační metody 47

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 49

5.1 MATERIÁL 49

5.1.1 Biologický materiál a chemikálie 49

5.1.1.1 Biologický materiál 49

5.1.1.2 Chemikálie 49

5.1.2 Laboratorní pomůcky a přístroje 50

5.2 METODY 51

5.2.1 Postup analýzy zpracování biologického vzorku bez derivatizace 51

5.2.1.1 Příprava kalibrační křivky 51

5.2.1.2 Postup extrakce v 80% MeOH a 80% IsoP s 0,1% TFA 51
5.2.1.3 Postup extrakce v 0,2 mol.dm^{-3} $HClO_4$ 53
5.2.1.4 Chromatografická separace (ARION® Polar C18) 54
5.2.2 Postup analýzy zpracování biologického vzorku s derivatizací 56
5.2.2.1 Příprava kalibrační křivky 56
5.2.2.2 Postup extrakce v 80% MeOH, v 80% MeOH s 0,1% TFA, v 90% AcN a v 90% AcN s 0,1% TFA 57
5.2.2.3 Postup extrakce v 0,1% FA a v 90% AcN s 0,01% FA 59
5.2.2.4 Chromatografická separace (Restek RAPTOR C18) 61
5.2.3 Hmotnostně spektrometrická analýza 63

6 VÝSLEDKY 64

6.1 Optimalizace extrakce a LC-MS analýza nederivatizovaného biologického vzorku 64
6.1.1 Srovnání účinnosti extrakčních činidel – 80% MeOH, nebo 80% IsoP s 0,1% TFA, 0,2 mol.dm^{-3} $HClO_4$ 64
6.2 Měření a kvantifikace nederivatizovaných vzorků 67
6.2.1 Kalibrační křivky 67
6.2.2 Kvantifikace vzorků 68
6.3 Optimalizace extrakce a LC-MS analýza derivatizovaného biologického vzorku 70
6.3.1 Volba vhodné mobilní fáze chromatografické separace 70
6.3.2 Porovnání různých extrakčních činidel 71
6.3.3 Optimalizace extrakce 73
6.3.4 Optimalizace koncentrace AcN v derivatizovaném vzorku 74
6.3.5 Optimalizovaný pracovní protokol zpracování vybraných částí těla včely medonosné (Apis mellifera) za účelem kvantifikace BAs dopaminu, oktopaminu a histaminu 76
6.4 Měření a kvantifikace derivatizovaných vzorků 79
6.4.1 Kalibrační křivky 79
6.4.2 Kvantifikace ve vybraných vzorcích včel trpících varoózou 80
6.4.3 Kvantifikace ve vybraných vzorcích včel ošetřených nespecifickým herbicidem PQ 82
6.4.4 Kvantifikace ve vzorcích včel obsahujících jedovou žlázu, nebo včelí jed 84

7 DISKUSE 87

8 ZÁVĚR 91

9 LITERATURA 93

10 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK 103

2 CÍLE

1. Vypracování literární rešerše o biologických funkcích a tkáňovém výskytu vybraných biogenních aminů (BAs).
2. Kompletace literárních podkladů o analytické detekci a kvantifikaci vybraných BAs v tkáních hmyzu.
3. Vývoj a optimalizace LC-MS metod pro detekci a kvantifikaci BAs – dopaminu, oktopaminu a histaminu.

3 ÚVOD

Celosvětově se chovatelé včel potýkají s rapidním snižováním a úhynem populací včely medonosné (*Apis mellifera*) a ostatních druhů včel. Rod *Apis* je hlavním opylovačem nepřeberného množství rostlin a plodin, z toho důvodů je velmi důležité jeho zachování, a to nejen za účelem zachování stability celého rostlinného a živočišného ekosystému, ale i z důvodu produkce zemědělských plodin (Lima *et al*., 2022). Úbytky včelích populací jsou přisuzovány rostoucí míře urbanizace naší planety, zvýšenému používání pesticidů, xenobiotik a jiným abiotickým a biotickým stresorům, jež v důsledku vedou k oslabení imunity včelího organismu (van Engelsdorp a Meixner, 2010; Maebe *et al*., 2021). Na správnou funkci včelího imunitního systému mají vliv i BAs (především dopamin, oktopamin a histamin), jež jsou hlavním předmětem předložené práce.

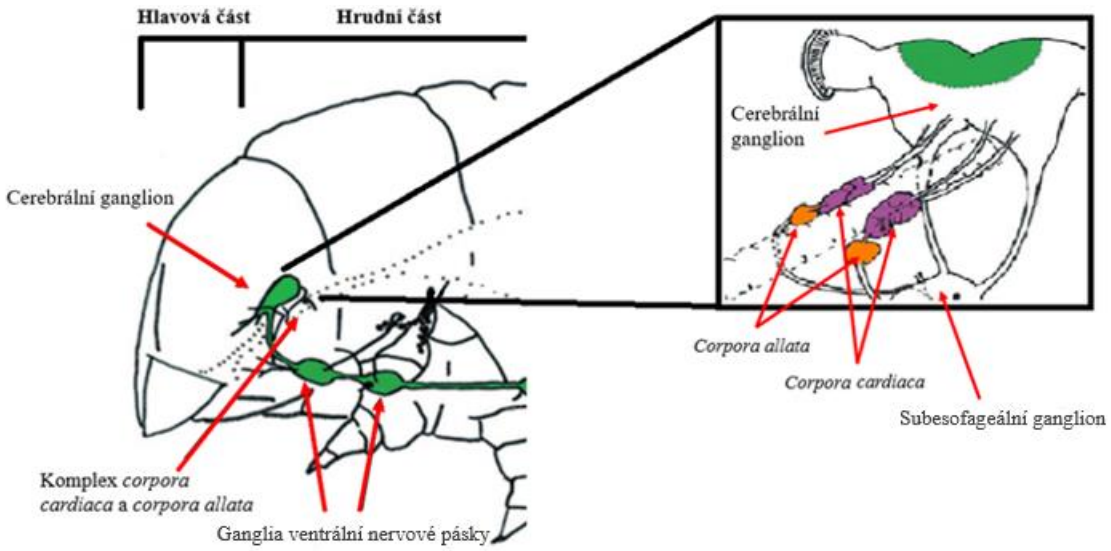
Tvorba a míra účinku BAs v těle hmyzu je velmi úzce spjata s nervovou soustavou, které dominuje cerebrální ganglion. V jedné z jeho částí dochází k tvorbě dopaminu, oktopaminu a histaminu, které jsou následně distribuovány do specifických částí těla jedince, kde se po jejich navázání na specifické receptory vyznačují různorodými účinky, jež ovlivňují životně důležité pochody a komplexní chování hmyzu (Blenau a Baumann, 2001; Insausti a Lazzari, 2021). BAs jsou široce rozšířené nízkomolekulární sloučeniny bazického charakteru, jímž disponují z důvodu přítomnosti jedné nebo více aminoskupin ve své struktuře.

Předložená práce je zaměřena na extrakci, separaci, detekci a kvantifikaci BAs ze vzorků různých částí těla včely medonosné (*Apis mellifera*) se zaměřením na tři konkrétní aminy – dopamin, oktopamin a histamin. Zmíněným molekulám je věnována pozornost v rámci tvorby komplexního pracovního protokolu jejich zpracování za současného využití velmi specifické a robustní metody LC-MS. Potenciální pracovní protokol spolu s celou předloženou diplomovou prací má za úkol shrnout a prohloubit znalosti a zjištěná fakta o BAs, jejich fungování v hmyzím těle, o vhodné extrakci vzorku za účelem jejich detekce s co nejvyšší účinností a najde své uplatnění při výzkumu imunity včelstev v České republice a ostatních evropských zemích.

4 LITERÁRNÍ REŠERŠE

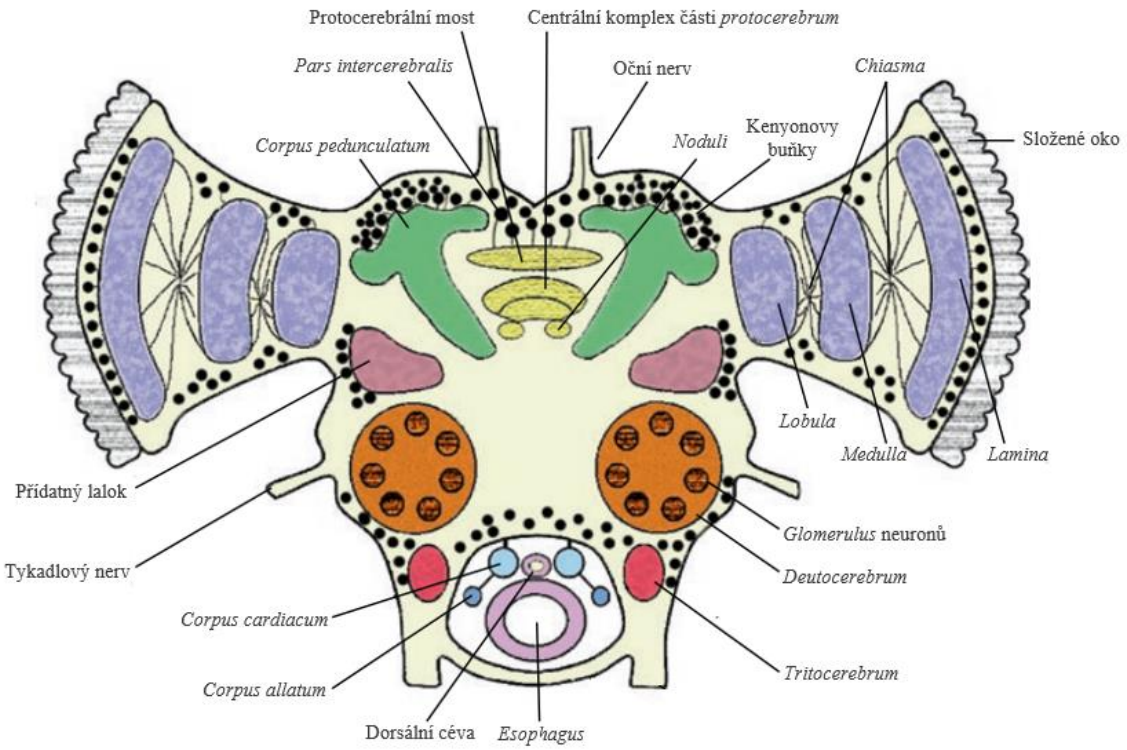
4.1 Anatomie hmyzího mozku

Nervová soustava hmyzu sestává z centrálního nervového systému (CNS), jenž je propojen s periferním nervovým systémem. CNS je tvořena cerebrálním ganglionem (hmyzí ekvivalent mozku obratlovců) s napojenou ventrální nervovou páskou, která obsahuje další ganglia (subesofageální ganglion a ganglia v hrudní a abdominální části těla). Cerebrální ganglion se nachází v hlavové části těla jedince (Insausti a Lazzari, 2021; Obr. 1).



Obrázek 1: Lokalizace cerebrálního ganglionu v těle hmyzu – znázornění s detailem na komplex cerebrálního ganglionu s tkáněmi *corpora cardiaca* a *corpora allata*; upraveno z Kodrík, 2014.

Cerebrální ganglion je složen ze tří částí: *protocerebrum*, *deutocerebrum* a *tritocerebrum* (Insausti a Lazzari, 2021). Názorné schéma anatomie hmyzího cerebrálního ganglionu s rozdělením na jednotlivé části je popsáno na obrázku (Obr. 2). *Protocerebrum* je složeno z optického laloku přenášející vizuální vjemy ze složených očí hmyzu – každý z optických laloků sestává ze tří neuropilových komplexů: *lamina*, *medulla* a *lobula* (Akashi *et al*., 2018; Insausti a Lazzari, 2021; Obr. 2). *Deutocerebrum* souvisí s vjemy z okolí zprostředkované čichovými a anténními laloky zasahující až do tykadlové části hmyzu – zpracovává především čichové vjemy (Insausti a Lazzari, 2021). *Tritocerebrum*, nejmenší část cerebrálního ganglionu, je lokalizováno směrem k ventrální nervové pásce a slouží hlavně k jejímu propojení s cerebrálním ganglionem (Insausti a Lazzari, 2021).



Obrázek 2: Schéma anatomie hmyzího cerebrálního ganglionu s popisem vybraných částí; upraveno z Insausti a Lazzari, 2021.

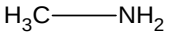
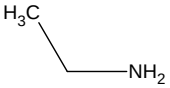
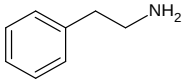
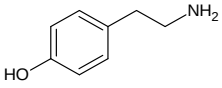
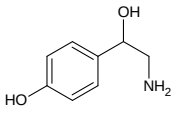
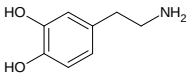
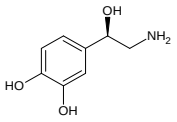
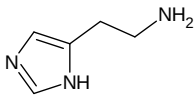
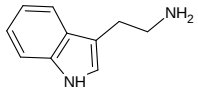
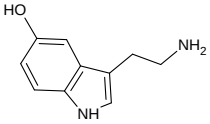
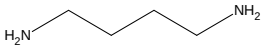
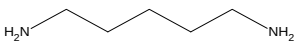
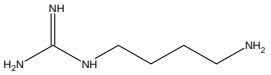
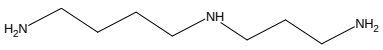
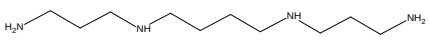
Protocerebrum obsahuje mimo jiné také některé tkáně úzce související s energetickým metabolismem hmyzu a s metabolismem BAs (Roeder, 2005; Verlinden, 2018; Insausti a Lazzari, 2021). Uskupení neuroendokrinních tkání *corpora cardiaca* a *corpora allata* související s BA dopaminem je spojeno s aktivací adipokinetického hormonu, což následně vede ke změně v distribuci energie (Roeder, 2005). Tkáň *corpora pedunculata* (anglicky „mushroom body“) souvisí s učením a pamětí hmyzu (Verlinden, 2018; Insausti a Lazzari, 2021).

4.2 Biogenní aminy (BAs)

Jedná se o přirozeně se vyskytující nízkomolekulární látky, které jsou spolu s dalšími životně důležitými molekulami tvořeny a degradovány anabolickými a katabolickými procesy mikroorganismů, rostlin a živočichů a jsou zapojeny do velkého množství důležitých fyziologických procesů (ten Brink *et al*., 1990; Nuñez *et al*., 2016). BAs patří mezi bazické molekuly obsahující ve své struktuře aminoskupiny (Santos, 1996). Vyznačují se také značnou teplotní stabilitou a v organismech jsou tvořeny především dekarboxylací příslušných aminokyselin (AMKs) či transaminačními reakcemi aldehydů a ketonů – od prekurzorových AMK, ze kterých jsou dané BAs tvořeny, se následně odvíjí i jejich názvosloví (Santos, 1996; Nuñez *et al*., 2016).

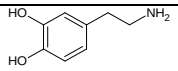
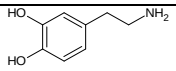
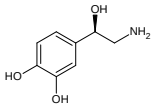
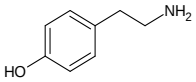
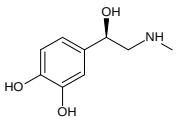
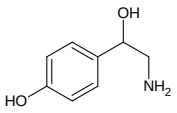
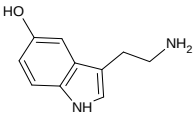
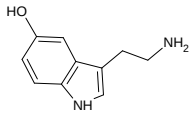
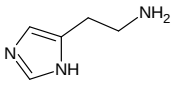
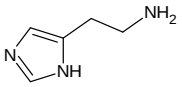
Dělení jednotlivých zástupců BAs závisí na počtu aminových skupin a na chemické struktuře, přičemž podle počtu aminových skupin jsou BAs děleny na monoaminy, diaminy a polyaminy, chemickou strukturou je u těchto aminů upřesněno, zda se jedná o alifatické, aromatické či heterocyklické molekuly (ten Brink *et al*., 1990; Santos, 1996; Nuñez *et al*., 2016). Třídění a struktura BAs také koresponduje s mechanismem jejich tvorby – přímou dekarboxylací z příslušných AMKs vzniká histamin, tyramin, tryptamin, kadaverin, agmatin, putrescin (ten může vznikat i odštěpením guanidinové skupiny z agmatinu) a fenylethylamin. Navazující kondenzační a hydroxylační reakce jsou vyžadovány při tvorbě spermidinu, sperminu, serotoninu, dopaminu, oktopaminu a norepinefrinu, kdy zároveň s nimi vznikají i jednoduché aminy methylamin a ethylamin jako odpadní produkty (Nuñez et al., 2016). Pro lepší přehlednost je uvedeno rozdělení BAs v tabulce (Tab. 1). V organismech plní BAs funkci fyziologické odpovědi na interní a externí stresory a zároveň mohou sloužit jako zdroj dusíku pro *de novo* syntézu nukleových kyselin, proteinů, hormonů a alkaloidů (Nuñez et al., 2016). Tato práce je věnována především BAs zapojeným do nervové signalizace bezobratlých organismů v souvislosti s jejich fyziologickým chováním se specifickým zaměřením na sociální hmyz.

Tabulka 1: Přehled klasifikace BAs v organismech; vytvořeno podle: Nuñez et al., 2016; obrázky strukturních vzorců vytvořeny v programu ChemSketch.

Název BA	Sumární vzorec	Strukturní vzorec	Klasifikace
Methylamin	CH_5N		Monoamin alifatický
Ethylamin	C_2H_7N		Monoamin alifatický
Fenylethylamin	$C_8H_{11}N$		Monoamin aromatický
Tyramin	$C_8H_{11}NO$		Monoamin aromatický
Oktopamin	$C_8H_{11}NO_2$		Monoamin aromatický
Dopamin	$C_8H_{11}NO_2$		Monoamin aromatický
Norepinefrin	$C_8H_{11}NO_3$		Monoamin aromatický
Histamin	$C_5H_9N_3$		Monoamin heterocyklický
Tryptamin	$C_{10}H_{12}N_2O$		Monoamin heterocyklický
Serotonin	$C_{10}H_{12}N_2O$		Monoamin heterocyklický
Putrescin	$C_4H_{12}N_2$		Diamin alifatický
Kadaverin	$C_5H_{14}N_2$		Diamin alifatický
Agmatin	$C_5H_{14}N_4$		Polyamin alifatický
Spermidin	$C_7H_{19}N_3$		Polyamin alifatický
Spermin	$C_{10}H_{26}N_4$		Polyamin alifatický

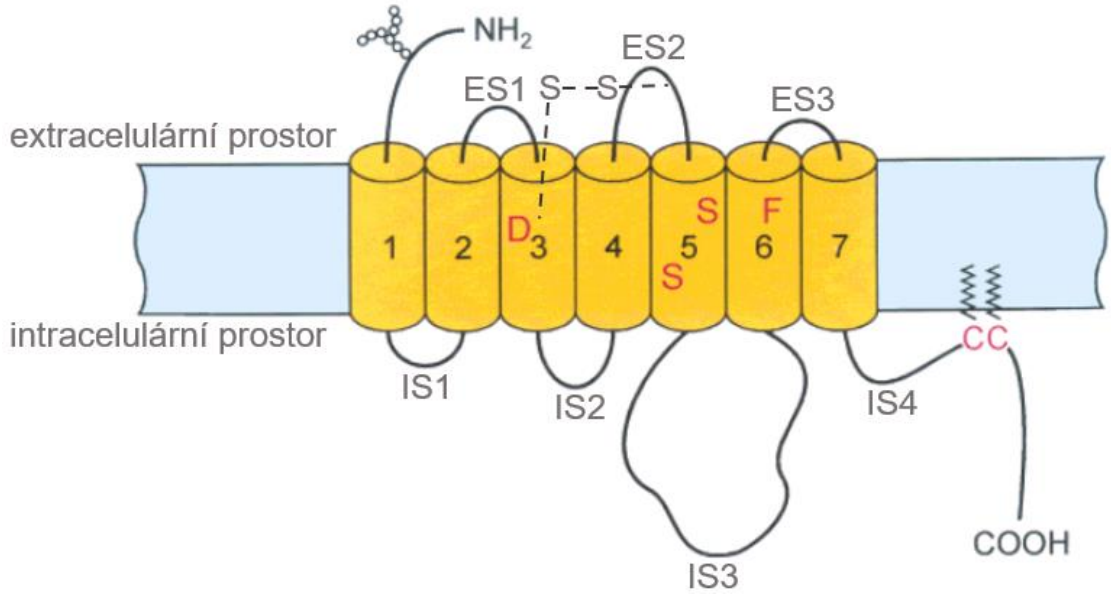
V centrálním nervovém systému obratlovců a bezobratlých slouží BAs norepinefrin, epinefrin, serotonin, dopamin, oktopamin, histamin a tyramin k přenosu vzruchu mezi neurony chemickou cestou – mají roli neurotransmiterů, neuromodulátorů a neurohormonů. Některé z nich mohou mít přesahující funkce, kdy regulují metabolické pochody uvnitř neurálního prostoru, nebo jsou uvolněny do krve či hemolymfy, prostřednictvím kterých jsou transportovány do konkrétních tkání v těle jedince, kde mají specifický účinek při navázání na svůj receptor (Blenau a Baumann, 2001). Rozdíly ve struktuře a zastoupení hlavních BAs obratlovců a bezobratlých jsou patrné v tabulce (Tab. 2). Metabolicky specifickými a izolovanými postupy dochází následně v organismu k ovlivnění mnoha životně důležitých funkcí včetně termoregulace, regulace cirkadiánního rytmu, endokrinní sekrece, kontroly kardiovaskulární soustavy, schopnost učení, zapamatování si a mnoho dalších (Evans, 1980; Blenau a Baumann, 2001; Erdag *et al.*, 2019). Tato práce je zaměřena konkrétně na tři zástupce hmyzích BAs, jež se v jejich těle primárně váží na receptory spřažené s G-proteinem (GPCRs), a sice na dopamin, oktopamin a histamin (Blenau a Baumann, 2001).

Tabulka 2: Přehled majoritně zastoupených BAs u obratlovců a bezobratlých živočichů; vytvořeno podle: Blenau a Baumann, 2001; obrázky strukturních vzorců vytvořeny v programu ChemSketch.

BAs obratlovců	Strukturní vzorec	BAs bezobratlých	Strukturní vzorec
Dopamin		**Dopamin**	
Norepinefrin		**Tyramin**	
Epinefrin		**Oktopamin**	
Serotonin		**Serotonin**	
Histamin		**Histamin**	

4.2.1 STRUKTURA RECEPTORŮ BAS A JEJICH SIGNÁLNÍ DRÁHY

Většina receptorů BAs je řazena do skupiny GPCRs, konkrétně spadají do podskupiny receptorů podobných rhodopsinu (rhodopsin-like receptors, RLRs), což jsou integrální membránové proteiny (Blenau a Baumann, 2001). V závislosti na krystalové struktuře RLRs a dalších provedených analýzách je jejich struktura založena na propojeném komplexu sedmi transmembránových domén, kdy je C-konec daného receptoru lokalizován intracelulárně, kdežto N-konec RLR obsahující obvykle specifické uspořádání motivů umožňující jeho glykosylaci se nachází v extracelulárním prostoru (Strader *et al*., 1995; Palczewski *et al*., 2000; Blenau a Baumann, 2001). Sedm transmembránových domén je propojeno třemi intracelulárními (IS) a třemi extracelulárními smyčkami (ES) (Obr. 3). Strukturní stabilita receptoru a jeho vazebného místa je poté pravděpodobně zajištěna pomocí disulfidického můstku tvořeného dvěma cysteiny (C), a to mezi transmembránovou doménou 3 a druhou extracelulární smyčkou (Noda *et al*., 1994). Polypeptidický řetězec C-konce nacházející se v intracelulárním prostoru obsahuje také C residua, která mohou dále stabilizovat strukturu receptoru, přičemž dochází k jejich posttranslační modifikaci – polmitoylaci – za tvorby další, čtvrté, intracelulární smyčky (Blenau a Baumann, 2001).

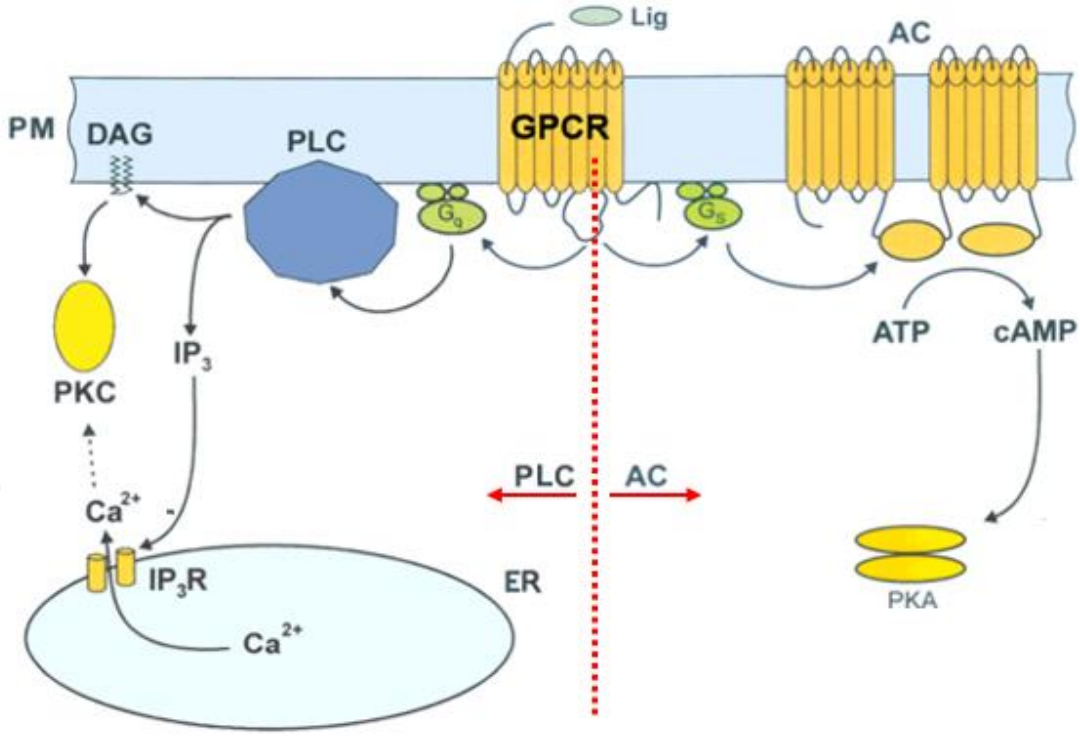


Obrázek 3: Struktura receptoru biogenních aminů (transmembránové domény jsou vyobrazeny jako válce; malé propojené kroužky u N-konce zobrazují glykosylaci tohoto konce; IS – intracelulární smyčky; ES – extracelulární smyčky; D – residuum aspartátu; S – residua serinu; F – residuum fenylalaninu; propojení ES2 a třetí transmembránové domény pomocí disulfidického můstku je vyobrazeno dvěma písmeny S propojenými přerušovanou čárou); upraveno z Blenau a Baumann, 2001.

Navázání specifického BA aktivuje receptor. BAs interagují s jednotlivými doménami receptorů na vnější straně membrány – pomocí konkrétních AMKs residuí, která se váží na funkční skupiny BAs je určena specifita receptoru k danému BA (Blenau a Baumann, 2001). Konkrétně specifita receptorů závisí na uskupení tří AMKs residuí v jejich struktuře: aspartátové residuum (D) nacházející se ve třetí transmembránové doméně, serinová residua (S) nacházející se v páté transmembránové doméně a fenylalaninové residuum (F) nacházející se v šesté transmembránové doméně (Obr. 3). Po správném navázání BA dochází ke změně konformace receptoru a aktivaci G-proteinu – započetí, efektivita a specifita signalizace spojené s aktivací RLRs souvisí také se změnou konformace druhé, třetí a čtvrté intracelulární smyčky a její ukončení souvisí s fosforylací C-konce a třetí intracelulární smyčky (Chuang *et al*., 1996; Blenau a Baumann, 2001).

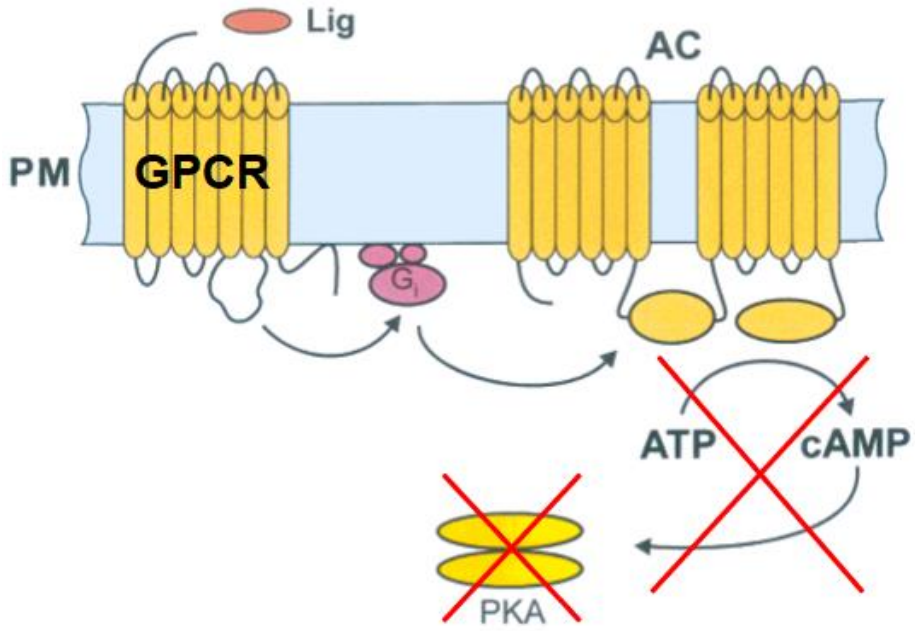
Na aktivaci GPCRs v hlavové části hmyzu navazuje nárůst koncentrace a mobilizace sekundárních vnitrobuněčných poslů. Buňka může být aktivována signální drahou zahrnující enzym ATP difosfátlyasa (cyklizující; 3',5'-cyklický-AMP-formující) (adenylátcyklasa, AC, EC 4.6.1.1), či enzym 1-fosfatidyl-1D-*myo*-inositol-4,5-bisfosfát inositoltrisfosfohydrolasa (fosfolipasa C, PLC, EC 3.1.4.11) – oba uvedené enzymy jsou zakotveny v plazmatické membráně buňky orientovány svým aktivním místem dovnitř této buňky (Blenau a Baumann, 2001).

Signální dráha zahrnující PLC je spuštěna odtrhnutím α podjednotky G_q-proteinu ($G_{\alpha q}$), jež je způsobena navázáním ligandu – v podobě BA – na příslušný RLR. $G_{\alpha q}$ podjednotkou je stimulována hydrolytická aktivita PLC – štěpení membránově vázaného fosfatidylinositolu-4,5-bisfosfátu na dva sekundární posly: inositol 1,4,5-trisfosfát (IP_3) a diacylglycerol (DAG). IP_3 volně difunduje do vnitřního prostoru buňky, kde se váže na své receptory (IP_3R) nacházející se především na membráně endoplazmatického retikula, které ovlivňují hladinu intracelulárních Ca^{2+} iontů. Prostřednictvím Ca^{2+} iontů jsou aktivovány iontové kanály a také proteiny (kalmodulin, kalbindin, kalretinin a jiné) ovlivňující modulaci jiných makromolekul – modulace spočívá v interakci: aktivovaný Ca^{2+} protein-efektor proteinového původu. DAG, který je stále vázán v membráně buňky, aktivuje (v kontrastu s IP_3) enzym ATP:protein fosfotransferasa (DAG-dependentní) (proteinkinasa C, PKC, EC 2.7.11.13). Ta aktivuje mnohé efektorové proteiny jejich fosforylací (především v místech S a threoninových (T) residuí), ovšem ke své aktivaci potřebuje nejen DAG, ale i Ca^{2+} ionty, tudíž oba sekundární poslové pracují synergicky (Blenau a Baumann, 2001; Obr. 4 vlevo).



Obrázek 4: Schématické znázornění signalizace zprostředkované BAs (Lig – ligand) v těle hmyzu (levá část – signalizace využívající enzym PLC – fosfolipasa C, pravá část – signalizace využívající enzym AC – adenylátcyklasa; ER – endoplazmatické retikulum; PM – plazmatická membrána; GPCR – receptor spřažený s G-proteinem; DAG – diacylglycerol; G_q – G_q-protein; G_s – stimulační G-protein; ATP – adenosintrifosfát; cAMP – cyklický adenosinmonofosfát; PKA – proteinkinasa A; PKC – proteinkinasa C; IP_3 – inositol 1,4,5-trisfosfát; IP_3R – receptor inositol 1,4,5-trisfosfátu; Ca^{2+} – vápenaté kationty); upraveno z Blenau a Baumann, 2001.

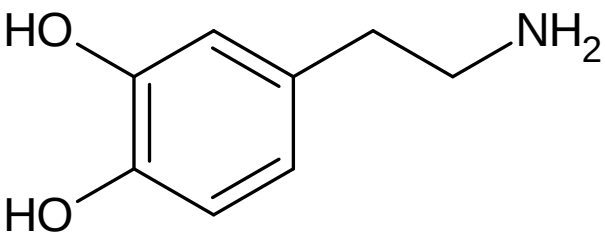
Další signální dráha zahrnující jiný enzym (AC) má svůj počátek opět v navázání BA na daný RLR za současné aktivace stimulujícího G-proteinu (G_s). Dochází k odštěpení α podjednotky G_s ($G_{\alpha s}$), jež interaguje s AC. Tento aktivovaný enzym katalyzuje přeměnu adenosintrifosfátu (ATP) na cyklický adenosinmonofosfát (cAMP). Sekundární posel cAMP následně aktivuje enzym ATP:protein fosfotransferasa (cAMP-dependentní) (proteinkinasa A, PKA, EC 2.7.11.1), který účinkuje podobně jako PKC na makromolekuly jako jsou cytosolické proteiny, iontové kanály a také na mnohé transkripční faktory (Obr. 4 vpravo). Při vazbě specifických BAs dochází i k inhibici této signální dráhy, kdy navázání BA na RLR vyústí v aktivaci α podjednotky inhibičního G-proteinu ($G_{\alpha i}$), která následně kompetuje o vazebné místo AC s $G_{\alpha s}$, což způsobí zpomalení či úplné zastavení AC aktivity (Blenau a Baumann, 2001; Obr. 5).



Obrázek 5: Schématické znázornění inhibované signalizace zprostředkované specifickými BAs (Lig – ligand) v těle hmyzu (AC – adenylátcyklasa; PM – plazmatická membrána; GPCR – receptor spřažený s G-proteinem; G_i – inhibiční G-protein; ATP – adenosintrifosfát; cAMP – cyklický adenosinmonofosfát; PKA – proteinkinasa A); upraveno z Blenau a Baumann, 2001.

4.2.2 DOPAMIN

Jedná se o nejvíce zastoupený BA a neurologicky aktivní molekulu v centrální nervové soustavě obratlovců a bezobratlých (Verlinden, 2018). Dopamin je z chemického hlediska řazen do skupiny sloučenin zvaných katecholaminy – molekuly obsahující katechol, na který je navázána aminová skupina (Obr. 6). S molekulovou hmotností 153,18 $g.mol^{-1}$ a pozitivní ionotropní aktivitou je zřejmé, že se jedná o relativně menší bazickou sloučeninu, jež je protonována v kyselém prostředí. Protonací je zásadně ovlivněna rozpustnost dopaminu, kdy je protonovaná forma výrazně rozpustnější ve vodě a relativně stabilní (Carter *et al.*, 1982; PubChem, 2023a). Přítomnost tohoto katecholaminu v rozmanitých druzích mikroorganismů, hub, rostlin a živočichů je důkazem jeho úzké souvislosti s vývojem nervových soustav všech těchto organismů, ke kterým docházelo už před několika stovkami milionů let (Verlinden, 2018).



Obrázek 6: Strukturní vzorec dopaminu; vytvořeno v programu ChemSketch.

4.2.2.1 Dopaminové receptory

V kontrastu se skutečností, že existuje v těle obratlovců 5 odlišných dopaminových receptorů (D_{1-5}), byly u jedinců hmyzu objeveny pouze 4 receptory s podobnou aktivitou, přičemž první tři receptory (Dop1, Dop2, Dop3) vykazují značnou podobnost se strukturou a funkcemi dopaminových receptorů obratlovců, tím pádem jsou i obdobně pojmenovány a klasifikovány (Verlinden, 2018). Čtvrtý dopaminový receptor u hmyzu (Dop/Ecd) může být aktivován nejen dopaminem, ale zároveň i ekdysonem či 20-hydroxyekdysonem (Evans *et al*., 2014).

Funkce Dop1 a Dop2 receptorů u bezobratlých, a tedy i u hmyzu, spočívá především ve zvýšení hladiny cAMP uvnitř buňky, což u obratlovců zaštiťují receptory s velmi podobnou strukturou – tedy receptory příbuzné D_1 (Hill *et al*., 2016; Himmelreich *et al*., 2017). Zvláštnost Dop2 receptoru je také to, že je schopen se vázat zároveň i prostřednictvím $G_{\alpha q}$ podjednotky, čímž udržuje optimální hladinu Ca^{2+} iontů i za nízké koncentrace dopaminu, která by byla za normálních podmínek signalizace prostřednictvím cAMP snižována (Hill *et al*., 2016; Himmelreich *et al*., 2017). Samotná exprese genu pro Dop1 receptor navíc zvyšuje hladinu intracelulárního cAMP i za nepřítomnosti dopaminu jako agonisty těchto receptorů (Meyer *et al*., 2012).

Naopak hmyzí Dop3 receptor, se strukturou příbuznou D_2 receptorům u obratlovců, působí po navázání dopaminu jiným efektem než Dop1 a Dop2 receptory, kdy snižuje hladinu cAMP uvnitř buněk, nicméně zároveň zvyšuje množství intracelulárních Ca^{2+} iontů (Bai a Palli, 2016; Verlinden *et al*., 2015). Exprese genu pro Dop3 receptor pak působí podstatný nárůst cAMP uvnitř buňky (Verlinden *et al*., 2015). Bai a Palli (2016) ve své práci zároveň popsali působení nejen dopaminu, ale i hmyzího juvenilního hormonu na Dop3 receptor u druhu *Tribolium castaneum* (potemník hnědý), přičemž měl juvenilní hormon při nižších koncentracích analogický účinek jako dopamin – snížení hladiny cAMP.

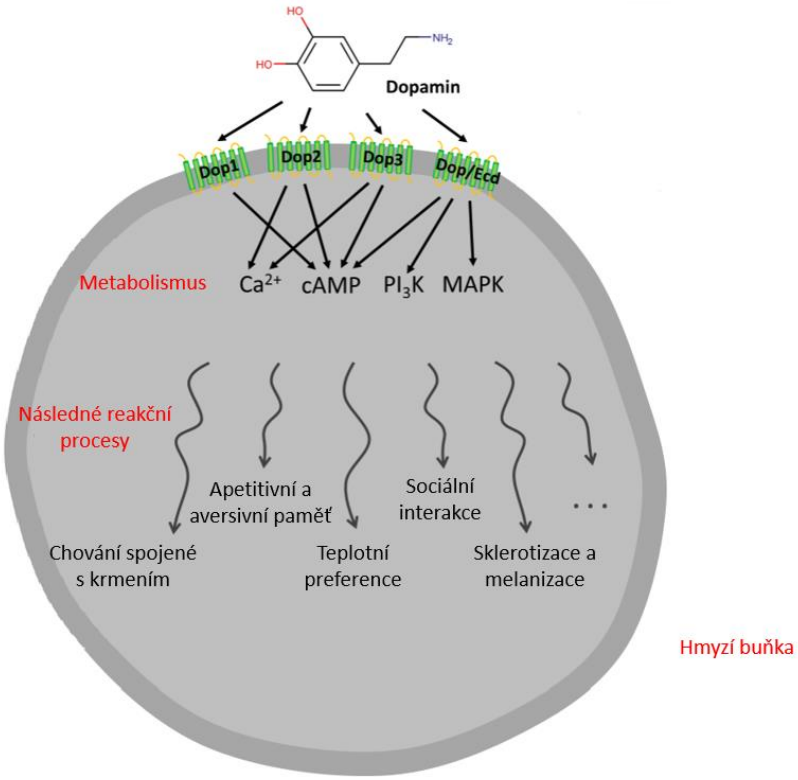
Dop/Ecd receptor identifikovaný u druhu *Drosophila melanogaster* může být aktivován dvěma způsoby. Jedním z aktivátorů je dopamin, který vede v souvislosti s aktivací Dop/Ecd receptoru ke zvýšení intramolekulárního cAMP a k signalizaci zprostředkované enzymem PLC (Obr. 4 vlevo). Dalšími agonisty jsou molekuly ekdysonu či 20-hydroxyekdysonu, které inhibují okamžitě účinek dopaminu na receptor a podporují signální dráhu spojenou s proteinkinasou aktivovanou mitogenem

(mitogen-activated proteinkinase, MAPK), například při procesu ekdyse – svlékání hmyzu (Evans *et al*., 2014).

Mimoto působí na dopaminové receptory hmyzu určité syntetické molekuly, které se mohou chovat jednak jako agonisté, ale i antagonisté (Verlinden, 2018). Mezi hlavní agonisty receptorů různých druhů hmyzu je řazen 6-amino-5,6,7,8-tetrahydronaftalen-2,3-diolhydrobromid (6,7-ADTN; vliv na Dop1, Dop2, Dop3), bromokriptin (vliv na Dop1 a Dop3) a homovanillylalkohol (HVA; vliv na Dop3) (Beggs a Mercer, 2009; Verlinden *et al*., 2015; Xu *et al*., 2017). Klíčovými antagonisty dříve popsaných receptorů jsou flupentixol (vliv na Dop1, Dop2, Dop/Ecd a ve vyšších koncentracích na Dop3), butaklamol (vliv na Dop1, Dop2, Dop3 a Dop/Ect), 7-chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-fenyl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3-benzazepin (SCH-23390; vliv na Dop1, Dop2 a ve vyšších koncentracích na Dop3) a spiperon (vliv na Dop/Ecd) (Srivastava *et al*., 2005; Beggs *et al*., 2011; Verlinden *et al*., 2015; Xu *et al*., 2017).

4.2.2.2 Funkce dopaminu v těle hmyzu

Dopamin ovlivňuje intenzitu pohybu, motivaci, náladu, prožitek a paměť především u obratlovců. U bezobratlých a zástupců hmyzu souvisí s mnoha procesy, především pak s chováním spojeným s krmením jedince, jeho apetitivní (související se vjemy z potravy) a aversivní (související se vjemy z okolí) pamětí, teplotní preferencí, sociální interakcí, sklerotizací a melanizací, které napomáhají tvorbě vnější kostry jedince a mají vliv i na imunitu (Owald a Waddell, 2015; Mizunami a Matsumoto, 2017; Verlinden, 2018; Obr. 7). Podrobnější popis jednotlivých dějů je uveden níže. Pro přežití jedince je totiž velmi důležité přizpůsobení chování jedince okolí a externím stresorům, kdy je nutno, aby selektivně rozpoznal podněty dle jejich důležitosti a poté na ně správně reagovat (Paulk *et al*., 2014). Příslušná reakce je pak založena na fyziologických, behaviorálních a kognitivních aspektech jedince a dopamin jakožto neurotransmiter v ní hraje důležitou roli, přičemž koordinuje jednotlivé aspekty za účelem odpovědi, která bude pro jedince prospěšná, nikoliv škodlivá či nebezpečná (Verlinden, 2018).



Obrázek 7: Schématické znázornění principu vlivu BA dopaminu na stěžejní fyziologické, behaviorální a kognitivní procesy odehrávající se ve hmyzí buňce; upraveno z Verlinden, 2018.

Chování spojené s krmením je založeno na složení potravy hmyzu, kdy například jedinci na základě chuti mohou preferovat potravu s vysokým obsahem sacharidů, tedy chutnající sladce, před krmivem s vyšším obsahem alkaloidů, toxinů, či jiných mikro a makromolekul způsobující hořkou chuť (Mašek a Keene, 2016; Verlinden, 2018). Mimo pocit hladu a sytosti je krmení a chování spojené s ním závislé také na předešlé zkušenosti jedince s danou potravou. Po přijetí potravy dochází pomocí jednotlivých živin a získané energie z potravy k ovlivnění odštěpení příslušných neuropeptidů a neurohormonů (včetně dopaminu), kdy následuje zpětná kontrola, zda jedinec nepostrádá určitou živinu. Podle toho buď ukončí proces krmení, nebo prostřednictvím centra odměny nacházejícího se v cerebrálním ganglionu po příjmu potravy zpětně zvýší potřebu krmení (Slade a Staveley, 2016). Důležitým smyslem pro volbu vhodné potravy je také čich. Pachy a vůně z okolí souvisí s tkání *corpora pedunculata*, pomocí které hmyz chemicky identifikuje pachy a dokáže si je i zapamatovat – konkrétní buňky zodpovědné za zpracování čichového vjemu se nazývají Kenyonovy buňky (Verlinden, 2018). Ott a Rogers (2010) ve své studii uvádí, že u těch jedinců hmyzu, kteří prožili více výzev a stresových situací (jako krmení, vyšší hustota osídlení určitého místa a podobně), došlo k vyšší proliferaci

Kenyonových buněk, což mohlo vést k značnějšímu vyvinutí tkáně *corpora pedunculata* – tkáň byla u takto identifikovaných jedinců větší než u ostatních (Farris *et al*., 2001; Ismail *et al*., 2006). Právě s tkání *corpora pedunculata* a s Kenyonovými buňkami jsou spojeny dopaminergní neurony, které při správném fungování signalizace u jedince zprostředkované cyklickým adenosinmonofosfátem (cAMP) ovlivňují práh odpovědi na jednotlivé chemické komponenty potravy (Mašek a Keene, 2016).

Dopamin je také zapojen do apetitivního a aversivního učení a paměti jedince spojeného s externími stresory – v případě apetitivní paměti souvisí se vjemy z potravy, v případě aversivní paměti souvisí se vjemy z okolí (Owald a Waddell, 2015; Mizunami a Matsumoto, 2017). Princip krátkodobého apetitivního učení u členovců souvisí se synergickým účinkem a provázaností oktopaminu, který tento proces ovlivňuje větší měrou, a dopaminu, kdy například u jedince z rodu *Drosophila* je oktopaminem podmíněná paměť závislá i na dopaminu tím způsobem, že tato celé kaskáda vyžaduje signalizaci prostřednictvím specifických dopaminergních neuronů zvaných PAM (protocerebral anterior medial), které pocházejí z tkáně *corpora pedunculata* (Owald a Waddell, 2015; Mizunami a Matsumoto, 2017; Verlinden, 2018). Zvýšená hladina oktopaminu působí nárůst Ca^{2+} iontů právě v PAM neuronech. Navázáním oktopaminu na receptory nacházející se na PAM neuronech (α-oktopaminové receptory podobné adrenergním) vyústí v aktivaci těchto neuronů a formaci apetitivní paměti vázané k určitému podnětu (Verlinden, 2018). Aversivní paměť hmyzu je spjata s větším množstvím poddruhů dopaminergních neuronů pocházejících z tkáně *corpora pedunculata*, a sice s MB-M3 neurony spadající pod klastr PAM neuronů a s MB-MP1 a MB-MV1 neurony spadající pod klastr PPL1 neuronů (protocerebral posterior lateral 1) s odlišnou specifikací od PAM (Aso *et al*., 2012; Owald a Waddell, 2015). Signalizace zprostředkovaná dopaminem pravděpodobně způsobuje při jeho navázání na Dop1 receptor nabytí nové vzpomínky, kdežto při navázání dopaminu na α podjednotku G-proteinu Dop2 receptoru dochází k aktivnímu zapomínání aversivních pokynů jedince (Himmelreich *et al*., 2017). Podobným principem probíhá regulace apetitivní a aversivní paměti i u druhu *Gryllus bimaculatus* (Mizunami a Matsumoto, 2017). Lagisz *et al*. (2016) ve své studii uvádí, že míra exprese genu pro Dop/Ecd u druhu *Apis mellifera* v různých situacích poukazuje na jeho spojitost jak s apetitivními, tak i s aversivními znaky učení a paměti. V jiné studii je dále uvedena schopnost eliminace odéru hostitele

druhem *Aedes aegypti* při napadení tohoto hostitele, kdy je daná obranná schopnost zprostředkována dopaminem vázajícím se na Dop1 receptor (Vinauger *et al*., 2018).

Ve tkáni *corpora pedunculata* se u hmyzu odehrává zároveň i signalizace související s dopaminem, jež reguluje chování spojené s preferencí teploty jedincem (Verlinden, 2018). V experimentu prováděném u rodu *Drosophila* byla popsána inhibice syntézy dopaminu prostřednictvím změn v genové expresi, či přidáním chemických inhibitorů důležitých enzymů a také mutací Dop2 receptoru nacházejícího se na dopaminergních neuronech, kdy jedinci druhu *Drosophila melanogaster* po proceduře následně preferovali chladnější okolní prostředí – v případě inhibice syntézy mutací Dop2 receptoru bylo možné obnovení původní funkce zpětným vložením správného genu pro expresi Dop2 receptoru (Bang *et al*., 2011).

Sociální interakce, včetně sexuálních interakcí, také výrazně souvisí s katecholaminem dopaminem, a to především v rámci chování sociálního hmyzu (Verlinden, 2018). V rámci včelstva a rodu *Apis* souvisí chování a fyziologie jednotlivých jedinců se směsí různých molekul, která ovlivňuje dále důležité hormony a molekuly (včetně dopaminu) a nazývá se matčin (královnin) mandibulární feromon (anglicky „queen mandibular pheromone“; QMP) (Gervan *et al*., 2005; Verlinden, 2018). Jedna z jeho hlavních komponent je kyselina 9-oxo-decenová (9-ODA), pomocí které jsou matkou vábeni trubci při páření. Nicméně po páření je složení QMP obměněno a je následně cíleno na čichové receptory dělnic – vliv QMP na chování a fyziologii dělnic je stěžejním aspektem pro správné fungování celého včelstva (Beggs a Mercer, 2009; Jarriault a Mercer, 2012; Verlinden, 2018). Konkrétně zasahuje do několika pochodů ve včelstvu – reguluje rojení včel, aktivuje u mladých dělnic chování, při kterém opečovávají matku a krmí ji a také inhibuje vývoj vaječníků u všech dělnic, aby nemohlo dojít k současné přítomnosti dvou matek v jednom úlu (Jarriault a Mercer, 2012). Citlivost dělnic na QMP je závislá a je regulována senzorickými neurony nacházejícími se v jejich tykadlech (Beggs a Mercer, 2009), v případě vlivu na hladinu dopaminu souvisí s mírou exprese genu pro Dop3 receptor, který slouží jako vazebné místo složky daného feromonu – HVA (Verlinden, 2018). Nižší hladina dopaminu způsobená navázáním HVA na Dop3 receptor vyústí následně ve zpoždění ontogenetického vývoje mladých dělnic a ke snížení jejich krmení, přičemž odnětí matky z včelstva vede k opětovnému zvýšení hladiny dopaminu v cerebrálním ganglionu dělnic a také k aktivaci vývoje jejich vaječníků (Harris a Woodring, 1995; Vergoz, 2012). QMP působí nejen změnu v expresi genů pro

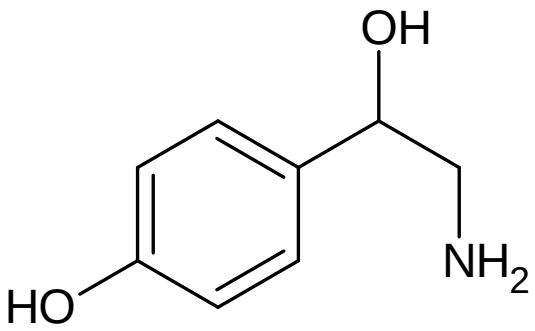
dopaminové receptory v cerebrálním ganglionu včel, nýbrž i v jejich vaječnících (Beggs *et al*., 2007). Vergoz *et al*. (2012) ve své práci poukazuje na souvislost s fertilitou dělnic v závislosti na Dop1 a Dop3 receptorech – při odnětí matky ze včelstva a nepůsobení QMP dochází v jejich vaječnících ke zvýšené expresi genů pro tvorbu Dop1, a naopak snížené genové expresi pro Dop3, který nejspíše úzce souvisí se sterilitou mladých dělnic. V dalších rešerších byla také uvedena spojitost mezi dopaminem a agresivním chováním u rodů *Gryllus* a *Drosophila* (Alekseyenko *et al*., 2013; Rillich a Stevenson, 2014).

Hladinou dopaminu jsou v těle jedince hmyzu regulovány procesy sklerotizace a melanizace jeho kutikuly (Andersen, 2010). Sklerotizace je děj, při němž z původně syntetizované bledé a měkké kutikuly vzniká pevná a tvrdá pomocí zesíťování (anglicky „cross-linking“) proteinů kutikuly s následnou dehydratací. Podle potřeby jedince probíhá sklerotizace na určitých částech těla ve větší míře, na jiných místech zase v míře menší – vysoce sklerotizovaná kutikula vykazuje vysokou pevnost a tvrdost, kdežto kutikula méně sklerotizovaná je ohebnější a více pružná (Gorman a Arakane, 2010; Verlinden, 2018). Tímto způsobem dojde u hmyzu k tvorbě exoskeletonu, jenž slouží jako stabilní schránka pro uchycení svalů a orgánů, ochraňuje vnitřní měkké části organismu a vnitřnosti a brání průniku patogenů a mikroorganismů do těla jedince (Verlinden, 2018). Následná pigmentace exoskeletonu neboli melanizace, chrání hmyz před nebezpečným slunečním zářením, umožňuje mimezi (mimikry), maskování, atrakci vůči partnerovi, hojení ran a aktivaci vrozené imunitní odpovědi (Sugumaran a Barek, 2016; Wang *et al*., 2017). Procesy sklerotizace a melanizace začínají tvorbou L-3,4-dihydroxyfenylalaninu (L-DOPA) z AMK L-tyrosinu. Dekarboxylační reakcí L-DOPA vzniká dopamin, který podléhá N-acetylaci za produkce N-accetyldopaminu (NADA) a N-β-alanyldopaminu (NBAD) – při započetí sklerotizace jsou po jejich transportu z epidermálních buněk do kutikulární matrix oxidovány na příslušné ortho-chinony a jejich deriváty. Ty poté reagují s proteiny kutikuly a způsobují jejich zesíťování (Andersen, 2010). Enzymy zapojené do těchto dvou dějů jsou především L-tyrosin, L-dopa:kyslík oxidoreduktasa (fenoloxidasa 3, PO3, EC 1.14.18.1) a L-tyrosin, tetrahydropteridin:kyslík oxidoreduktasa (3-hydroxylující) (tyrosin 3-monooxygenasa, TH, EC 1.14.16.2) – od jejich aktivity se odvíjí i míra tvrdosti a pigmentace kutikuly (Verlinden, 2018). Vzhledem k nepostradatelnosti dopaminu v procesu sklerotizace a melanizace závisí tvrdost a pigmentace kutikuly i na vystavení QMP v případě včelí kasty

dělnic, jelikož byla popsána diference mezi uhlovodíkovými profily kutikul odlišných vývojových stádií dělnic (Fan *et al*., 2010; Jarriault a Mercer, 2012).

4.2.3 OKTOPAMIN

Vedle dopaminu je tato molekula také velmi hojně zastoupena v nervové soustavě členovců – tedy i hmyzu – kdy u těchto prvoústých (*Protostomia*) zastupuje spolu s *p*-tyraminem funkci katecholaminů epinefrinu a norepinefrinu nacházejících se u vyšších druhoústých (*Deuterostomia*) organismů (Blenau a Baumann, 2001; Verlinden *et al*., 2010). Toto tvrzení je zároveň podpořeno skutečností, že se uvedené látky pouze minoritně liší svou strukturou od oktopaminu (Blenau a Baumann, 2001; Obr. 8). Oktopamin tedy hraje zásadní roli nejen v signální transdukci, ale také při stresové reakci jedince na vnitřní a vnější podněty (Mentel *et al*., 2003; Evans a Maqueira, 2005; Verlinden *et al*., 2010). Tato molekula je syntetizována specifickým klastrem DUM (dorsal unpaired median) neuronů, jež zároveň hrají zásadní roli při jeho sekreci (Verlinden *et al*., 2010). Oktopamin má v těle hmyzu vliv na téměř všechny smyslové orgány a také na orgány související s distribucí energie – tukové těleso a komplex tkání *corpora cardiaca* a *corpora allata* – přičemž aktivuje adipokinetický hormon hmyzu či s ním synergicky působí na tyto dvě hmyzí tkáně (Roeder, 2005). Poprvé byl oktopamin izolován z těla chobotnice (*Octopoda*), konkrétně z jejích slinných žláz, již v roce 1948, z toho důvodu dostal svůj název (Erspamer, 1948).



Obrázek 8: Strukturní vzorec oktopaminu; vytvořeno v programu ChemSketch.

4.2.3.1 Oktopaminové receptory

Tyto receptory spadající také do rodiny RLRs, která je součástí GPCRs, byly přesně popsány a klasifikovány v práci Evanse a Maqueiry (2005) se zaměřením na druh *Drosophila melanogaster*. Příslušné oktopaminové receptory byly rozděleny do tří skupin, které byly později překlasifikovány na čtyři skupiny: rodina α-receptorů podobných adrenergním (OctαR), β-receptorů podobných adrenergním (OctβR) a rodina

receptorů specifických pro oktopamin a tyramin, či čistě pro tyramin (TyrR) – právě tato poslední rodina receptorů byla později rozdělena na TyrRI a TyrRII podrodiny kvůli přesnějšímu rozlišení jejich interakce s oktopaminem a tyraminem (Verlinden *et al*., 2010).

OctαR jsou svou sekvencí AMKs vysoce podobné α-adrenergním receptorům obratlovců a vyznačují se vyšší afinitou k oktopaminu na rozdíl od tyraminu. Navázání oktopaminu na tento receptor způsobuje u jedince hmyzu aktivaci sekundárních poslů, konkrétně značné navýšení hladiny Ca^{2+} iontů uvnitř buněk za současného nepatrného zvýšení intracelulárního cAMP – pozdější značné zvýšení cAMP je interpretováno jako sekundární jev závislý až na uvolnění masivního množství Ca^{2+} iontů (Grohmann *et al*., 2003; Balfanz *et al*., 2005).

Podobnostmi s β-adrenergními receptory obratlovců se vyznačují OctβR, jež po konjugaci s oktopaminem aktivují specificky uvolnění cAMP do vnitrobuněčného prostoru (Verlinden *et al*., 2010). Na základě farmakologického profilu receptorů zkoumaného syntetickými analogy oktopaminu (agonisté a antagonisté) byla u zástupců hmyzu rodina OctβR později rozdělena do dalších podrodin receptorů v závislosti na testovaných jedincích – u rodu *Drosophila* byla rodina OctβR rozdělena do dalších tří podrodin, u rodu *Apis* dokonce do čtyř (Maqueira *et al*., 2005; Hauser *et al*., 2006; Verlinden *et al*., 2010).

Skupina TyrRI vykazuje určitou similaritu s α_2-adrenergním receptorem obratlovců, přičemž tato skupina receptorů je v těle hmyzu specifická především pro tyramin, nicméně také v menší míře pro oktopamin (Verlinden *et al*., 2010). Aktivované receptory dané skupiny mohou signalizovat dvě různé dráhy: ve většině případů dochází k navázání preferovaného tyraminu na receptor, což způsobuje snížení hladiny cAMP uvnitř buňky (Rotte *et al*., 2009), v ojedinělých situacích je na receptor navázán oktopamin, který je schopen aktivovat uvolnění Ca^{2+} iontů do intracelulárního prostoru buňky stejnou nebo dokonce i větší měrou než tyramin navázaný na TyrRI (Reale *et al*., 1997). Priorita molekuly navazující se na receptor je pravděpodobně určena upřednostněním určité signální dráhy v konkrétním okamžiku v závislosti na energetických požadavcích buňky (Verlinden *et al*., 2010).

V roce 2005 byl při výzkumu rodu *Drosophila* objeven další z oktopaminových receptorů patřící do rodiny RLRs, jenž je specifický striktně pro tyramin (Cazzamali *et*

al., 2005). Později pojmenované TyrRII, tyto receptory po navázání příslušného agonisty stimulují uvolňování Ca^{2+} iontů do intracelulárního prostoru (Huang *et al*., 2009). V pozdějších studiích byly skupina TyrRII charakterizována i u dalších hmyzích rodů (rody *Bombyx*, *Aedes*, *Acyrthosiphon*, *Anopheles*, *Culex*, *Tribolium*, *Pediculus* a *Apis*), což dalo popud k přepracování klasifikace oktopaminových receptorů a ke vzniku nové podrodiny (Verlinden *et al*., 2010).

Přírodní a syntetičtí agonisté a antagonisté oktopaminových receptorů mohou sloužit k farmakologické specifikaci receptorů a se svým účinkem mohou být využiti v praxi například jako pesticidy (Verlinden *et al*., 2010). Hlavní skupinou těchto látek jsou esenciální oleje. Samotné esenciální oleje a jejich komponenty, kterými jsou například eugenol, cinnamylalkohol či trans-anethol, totiž v těle hmyzu prokazatelně ovlivňují prostřednictvím oktopaminových receptorů hladinu Ca^{2+} iontů a AC, tím pádem i hladinu cAMP (Khan *et al*., 2003; Enan, 2005). Dalšími molekulami používanými v minulosti jako insekticidy jsou také formamidiny (Downer *et al*., 1985).

4.2.3.2 Funkce oktopaminu v těle hmyzu

Oktopamin uvolňovaný z DUM neuronů se ve vyšších koncentracích může vyskytovat v rámci nervové soustavy hmyzu i mimo ni (Verlinden *et al*., 2010). Ve hmyzím těle ovlivňuje značné množství biochemických pochodů spojených s energetickým metabolismem (vliv oktopaminu na tukové těleso a na uvolňování adipokinetického hormonu) a reakcemi na stresové podmínky z interního i externího prostředí jedince (Roeder, 2005).

Oktopamin hraje významnou roli při imunitní reakci bezobratlých, kdy dochází k jeho zvýšenému uvolňování do hemolymfy v závislosti na aktivaci imunitního systému jedince (Adamo, 2010). Toto se může zdát kontraproduktivní vzhledem ke skutečnosti, že oktopamin má na tělo hmyzu imunosupresivní účinek. Ovšem uvolněním oktopaminu a dalších hormonů stresové fáze dochází k inhibici nepřiměřené reakce imunitního systému, která by mohla vyústit v poškození jednotlivých tkání organismu (Verlinden *et al*., 2010). Hladinou hormonů stresové fáze (oktopamin nevyjímaje) je také kontrolována míra vynaložené energie pro imunitní reakci daného organismu – lze tedy tvrdit, že pomocí oktopaminu a dalších hormonů je určitým způsobem kontrolována a optimalizována míra imunitní reakce jedince (Adamo, 2010). Obdobná reakce byla ovšem pozorována i při stresových situacích nevyvolaných patogenním organismem – při

vystavení jedinců rodu *Locusta*, *Apis*, *Drosophila*, *Periplaneta* a *Tribolium* mechanickému stresu, zvýšené teplotě, hladovění či určitým chemickým sloučeninám byl obdobně pozorován nárůst hladiny oktopaminu a dalších stresových hormonů v jejich hemolymfě (Hirashima *et al*., 1992; Gruntenko *et al*., 2004; Armstrong *et al*., 2006; Chen *et al*., 2008; Verlinden *et al*., 2010).

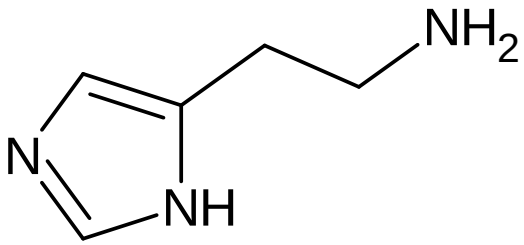
Oktopamin disponuje schopností interakce s jednotlivými neurony zodpovědnými za přenos nervového vzruchu ze sluchových receptorů, mechanoreceptorů, fotoreceptorů a chemoreceptorů na elektrické signály, které jsou vyhodnocovány cerebrálním ganglionem (Field *et al*., 2008). Oktopamin je schopen modifikovat citlivost uvedených receptorů a ovlivňovat tak například práh citlivosti jedince k jednotlivým složkám potravy v závislosti na její výživnosti a adaptaci na tuto potravu, míru jeho reakce na vizuální vjemy (především u druhu *Apis mellifera*) a také posílení jeho apetitivního chování v souvislosti s čichovými a vizuálními vjemy konzumované potravy (Scheiner *et al*., 2002; Unoki *et al*., 2006; Stern, 2009; Gervasi *et al*., 2010).

Dalšími významnými procesy, které jsou v hmyzím organismu ovlivněny oktopaminem, jsou například aktivace lokomoce a bdělosti, vliv na agresivitu jedince, kladení vajíček a také i spouštění ovulace u samiček (Lee *et al*., 2003; Chase a Koelle, 2007; Crocker a Sehgal, 2008; Potter a Luo, 2008). Významný účinek oktopaminu je spjat také s principem krátkodobého apetitivního učení členovců (Owald a Waddell, 2015; Mizunami a Matsumoto, 2017; viz kapitola 4.2.2.2).

4.2.4 HISTAMIN

Histamin je důležitý chemický posel v nervovém systému obratlovců a bezobratlých (Buchner *et al*., 1993). Je hlavním BA uvolňovaným přímo z fotosenzitivních (či fotoreceptorních) buněk hmyzu, které se nacházejí v optickém laloku cerebrálního ganglionu (Nässel, 1999; Blenau a Baumann, 2001). Zde pravděpodobně působí na své ionotropní receptory propouštějící Cl^- ionty (histamine-gated chloride channels; HCLCs), a takto jsou hyperpolarizována postsynaptická spojení specifických nervových buněk nacházejících se v prvním optickém komplexu neuropil (*lamina*), či druhém optickém komplexu neuropil (*medulla*) (Hardie, 1987; Hardie, 1989; Sarthy, 1991; Akashi *et al*., 2018). Jeho biosyntéza je založena na dekarboxylaci histidinu – s touto AMK má velmi podobnou strukturu (Obr. 9). Mimo nervovou soustavu se nachází ve značném množství

například v jedu některých druhů hmyzu – *Apis, Vespula, Bombyx, Solenopsis* a další (Britannica, 2022; Ramirez-Cruz *et al*., 2022).



Obrázek 9: Strukturní vzorec histaminu; vytvořeno v programu ChemSketch.

4.2.4.1 Histaminové receptory

V minulých letech byly identifikovány histaminové receptory pouze u obratlovců, tyto receptory byly roztříděny do tří rodin (H_{1-3}). Všechny tyto rodiny spadají pod GPCRs, přičemž H_1 spouští nárůst hladiny Ca^{2+} iontů uvnitř buněk, H_2 souvisí se zvýšením a H_3 se snížením aktivity AC, tím pádem mají vliv na regulaci intracelulárního cAMP. Nicméně u bezobratlých nebyly identifikovány receptory analogické k histaminovým receptorům obratlovců (Blenau a Baumann, 2001).

Z toho důvodu byla vznesena otázka, zda histaminové receptory bezobratlých spadají do rodiny GPCRs (Blenau a Baumann, 2001). V práci Skingsleyho *et al*. (1995) byl popsán vliv histaminu, který je uvolňován z buněk optického laloku, na hladinu Cl^- iontů v postsynaptických monopolárních buňkách, tím pádem vznikla teze, že by mohly být v těle hmyzu a ostatních bezobratlých přítomny histaminové receptory na bázi iontových kanálů (Blenau a Baumann, 2001).

Předešlé tvrzení bylo potvrzeno v následujících studiích, kdy byly identifikovány u druhu *Drosophila melanogaster* geny pro dva rozdílné HCLCs (*Dm*HCLCA a *Dm*HCLCB) (Gengs *et al*., 2002; Gisselmann *et al*., 2002; Zheng *et al*., 2002). Tyto kanály jsou schopny kontrolovat hladinu Cl^- iontů v příslušných buňkách prvního optického komplexu neuropil (*lamina*). Akashi *et al*. (2018) ve svém výzkumu identifikoval obdobné iontové kanály u motýla druhu *Papilio xuthus* (*Px*HCLCA, *Px*HCLCB). Uvedené iontové kanály spadají do velké rodiny receptorů, které obsahují ve své sktruktuře charakteristickou smyčku mezi dvěma C, mezi nimiž se nachází specifická sekvence třinácti AMKs – takovéto receptory se nazývají Cys-loop receptory (Thompson *et al*., 2010). Jejich pentamerní struktura může být složena z α a β podjednotek tvořících homomerní či heteromerní receptory v závislosti na druhu bezobratlého organismu, ze kterého byly geny pro tyto receptory izolovány (Akashi *et*

al., 2018). Hmyzí HCLCs jsou ovšem závislé nejen na histaminu, otevření těchto chloridových kanálů souvisí i s dalšími transmitery včetně kyseliny γ-aminomáselné (GABA), kyseliny glutamové (E) a 5-hydroxytryptaminu (5-HT; známého také pod názvem serotonin) (Ranganathan *et al*., 2000; Akashi *et al*., 2018).

4.2.4.2 Funkce histaminu v těle hmyzu

Nejdůležitější funkcí histaminu v těle hmyzu je právě výše zmíněná hyperpolarizace postsynaptických spojení specifických nervových buněk nacházejících se v prvním optickém komplexu neuropil (*lamina*), či druhém optickém komplexu neuropil (*medulla*). Podráždění hmyzích fotoreceptorů vizuálními vjemy z okolního prostředí následováno touto změnou v polarizaci umožňuje přenos vzruchu mezi jednotlivými neurony (Hardie, 1987; Hardie, 1989; Sarthy, 1991; Akashi *et al*., 2018). Bez přítomnosti histaminu v centrální nervové soustavě hmyzu tudíž nemohou jedinci například reagovat na světelné podněty a vnímat rozdíly mezi světlem a tmou (Borycz *et al*., 2005). Ačkoliv neovlivňuje absence histaminu ve vyvíjejícím se a dospělém organismu bezobratlých žádné životně důležité funkce, způsobuje u jedinců slepost způsobenou přerušením vzruchu mezi nervovými synapsemi (Burg *et al*., 1993; Blenau a Baumann, 2001).

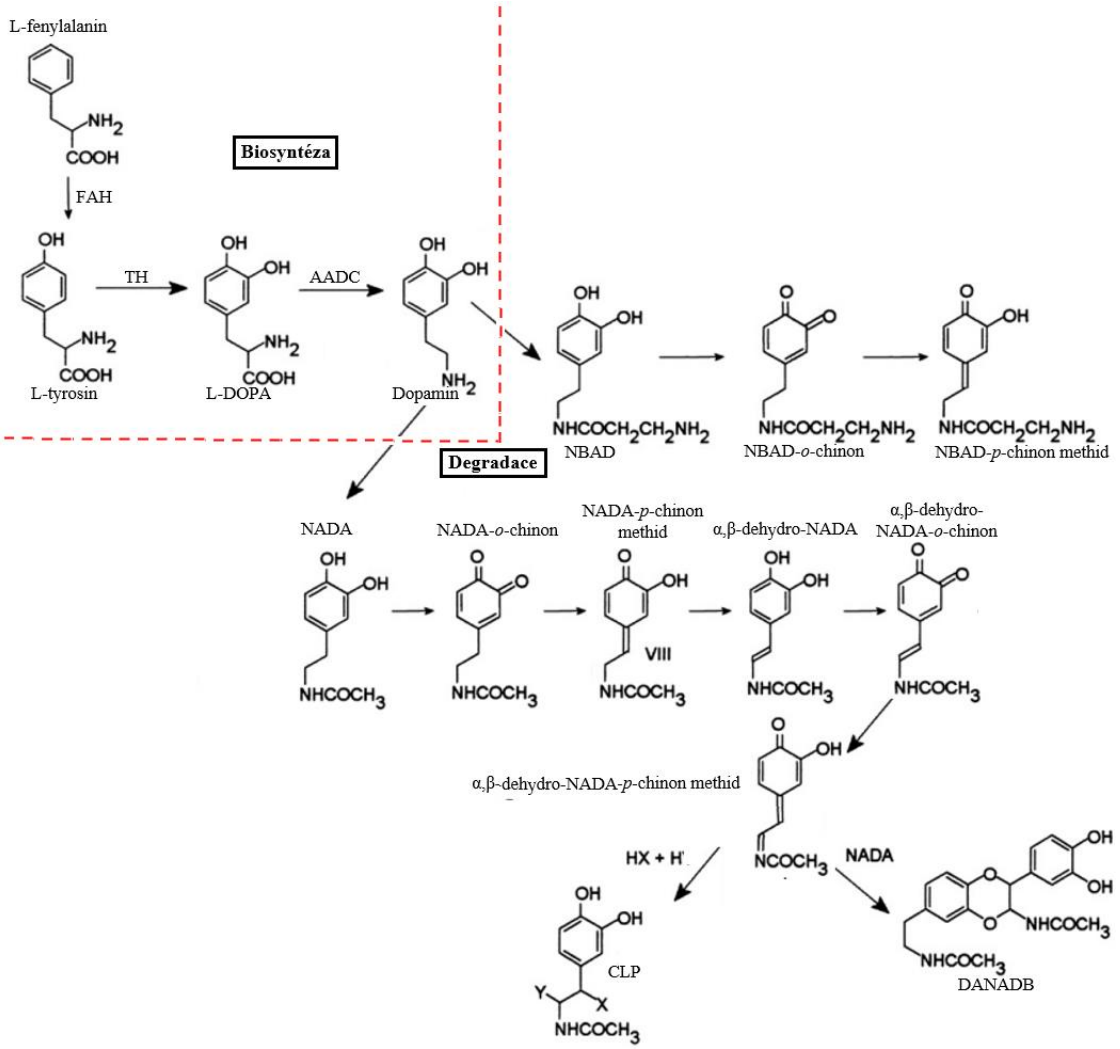
Další funkcí histaminu v těle hmyzu je aktivace imunoreaktivní odpovědi na externí a interní stresové podmínky (Nässel, 1999). Mimoto je tento BA spojen s transdukcí signálu z hmyzích mechanoreceptorů (Melzig *et al*., 1996). Ve vláskových buňkách (*sensilla*) rodu *Drosophila* byl totiž také detekován histamin, a tudíž je přímo vázán na mechanosensorický systém dospělých jedinců (Buchner *et al*., 1993). Histamin je tedy jedním z hlavních senzorických neurotransmiterů a interneuronových transmiterů v těle hmyzu (Nässel, 1999).

4.3 Metabolismus BAs v těle hmyzu

V kapitole 4.2 byl popsán vliv vybraných BAs na konkrétní procesy v těle hmyzu a jejich úloha v buněčné signalizaci, což je uskutečňováno v časovém rozmezí jejich aktivního stavu v organismu. Tato kapitola naopak informuje o vzniku a zániku, tedy biosyntéze a degradaci, tří vybraných BAs (dopamin, oktopamin a histamin) u bezobratlých.

4.3.1 DOPAMIN

Na rozdíl od prvoků (*Protozoa*), kteří jsou schopni pomocí šikimátové dráhy přeměnit sacharidy na aromatické AMKs (L-fenylalanin, L-tyrosin a L-tryptofan), není u živočichů (*Metazoa*) *de novo* syntéza těchto AMKs, a tedy i důležitých neuroaktivních molekul včetně BAs možná (Herrmann a Weaver, 1999). V živočišné říši tedy závisí biosyntéza dopaminu (i jiných BAs) na příjmu esenciálních AMKs (L-fenylalanin a L-tryptofan) a aktivitě specifických enzymů schopných jejich přeměny na další meziprodukty. V případě dopaminu se jedná o enzym L-fenylalanin, tetrahydropteridin:kyslík oxidoreduktasa (4-hydroxylující) (fenylalanin 4-monooxygenasa, FAH, EC 1.14.16.1) přeměňující L-fenylalanin na L-tyrosin a enzym TH, pomocí kterého dochází k tvorbě L-DOPA z L-tyrosinu – tyto dvě přeměny jsou počátečními reakcemi biosyntézy dopaminu (Kutchko a Siltberg-Liberles, 2013; Obr. 10). Reakce katalyzována TH je zároveň hlavním regulačním bodem biosyntézy dopaminu. V dalším kroku katalyzovaném enzymem aromatická-L-aminokyselina karboxylyasa (karboxyl štěpící, tvořící dopamin) (dekarboxylasa aromatických aminokyselin, AADC, EC 4.1.1.28) dochází k tvorbě dopaminu z L-DOPA (Obr. 10). V těle bezobratlých živočichů se nachází také homolog AADC, který katalyzuje reakci přeměny L-tyrosinu na tyramin, jenž je prekurzorem při biosyntéze oktopaminu (Verlinden, 2018; viz kapitola 4.3.2).



Obrázek 10: Schéma biosyntézy a degradace dopaminu v těle hmyzu a dalších bezobratlých organismů (TH – tyrosin-3-monooxygenasa; FAH – fenylalanin-4-monooxygenasa; AADC – dekarboxylasa aromatických aminokyselin; NBAD – N-β-alanyldopamin; NADA – N-acetyldopamin; CLP – „cross-linked product" – zesíťovaný produkt degradace dopaminu vedoucí ke sklerotizaci kutikuly; DANADB – 2-(3′, 4′-dihydroxyfenyl)-3-acetylamino-6-(N-acetyl-2′-aminoethyl)-2,3-dihydro-1,4-benzodioxin – produkt degradace dopaminu vedoucí také ke sklerotizaci kutikuly); upraveno z Andersen, 2010.

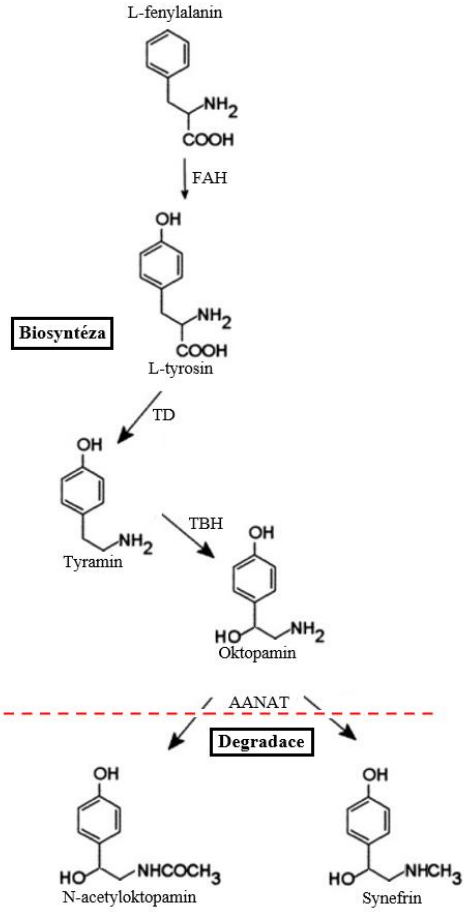
Aromatická aminokyselina L-tryptofan je analogicky přeměňována na 5-hydroxytryptofan za katalýzy enzymu L-tryptofan, tetrahydropteridin:kyslík oxidoreduktasa (5-hydroxylující) (tryptofan 5-monooxygenasa, TPH, EC 1.14.16.4) – vzniklý produkt je prekurzorem pro molekuly serotoninu a melaninu. Metabolické dráhy FAH, TH a TPH jsou úzce provázány. Všechny tyto enzymy obsahují ve své struktuře kofaktor tetrahydrobiopterin, který má ovšem pro jednotlivé enzymy rozdílnou afinitu. Nejvyšší afinitu má k enzymu FAH, což znamená, že při nedostatku kofaktoru bude přeměna L-fenylalaninu na L-tyrosin upřednostňována oproti přeměnám L-tyrosinu na L-DOPA či L-tryptofanu na 5-hydroxytryptofan. I samotná dostupnost

L-tyrosinu v těle hmyzu je limitována příjmem L-fenylalaninu potravou a aktivitou FAH (Thöny *et al*., 2000; Verlinden, 2018).

Dopamin je BA s relativně krátkodobým účinkem na postsynaptické buňky. Hlavní enzym účastnící se jeho degradace u obratlovců ovšem v těle bezobratlých přítomen není – jedná se o enzym amin:kyslík oxidoreduktasa (deaminující) (monoaminoxidasa, MAO, EC 1.4.3.4) (Kutchko a Siltberg-Liberles, 2013). U hmyzu jsou ale podrobně popsány procesy melanizace a sklerotizace, kterými dochází k degradaci dopaminu jeho transformací a zakomponováním do kutikuly jedince (Andersen, 2010; Verlinden, 2018; Obr. 10; viz kapitola 4.2.2.2).

4.3.2 OKTOPAMIN

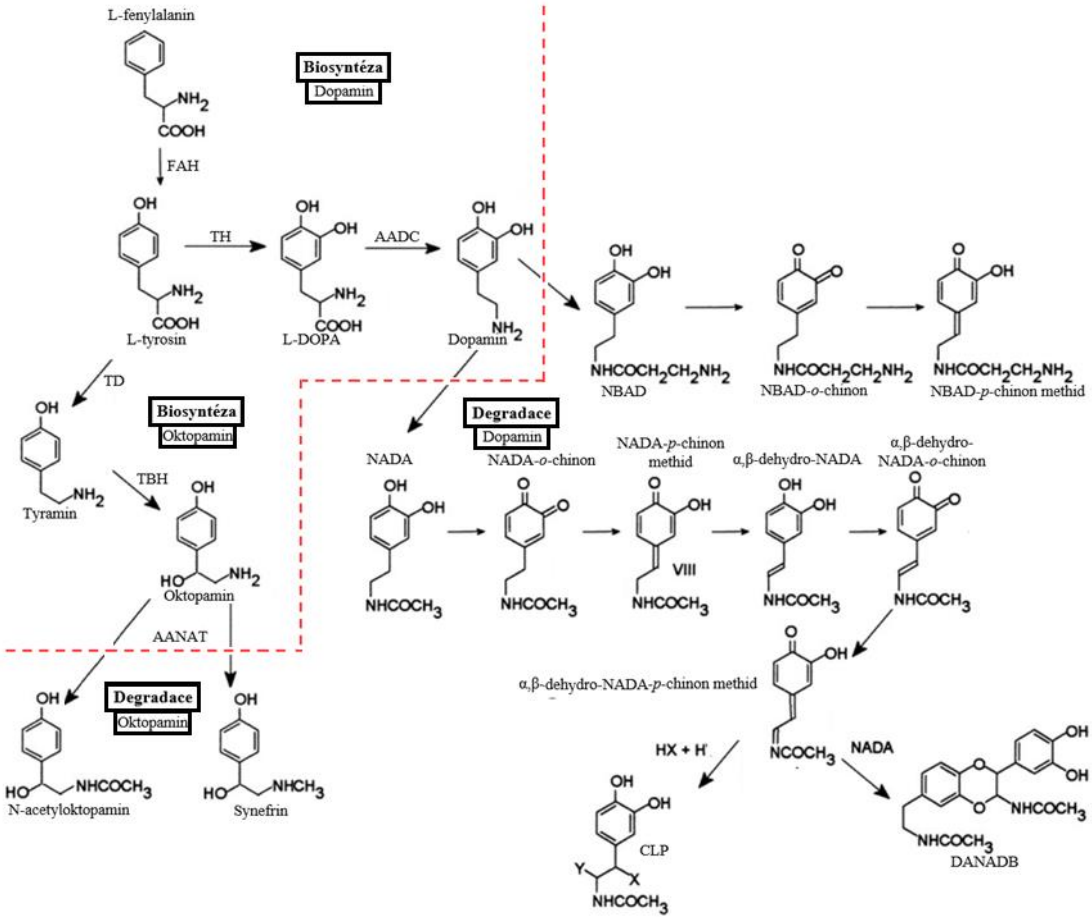
Biosyntéza oktopaminu je závislá především na AMK L-tyrosinu, tím pádem i na L-fenylalaninu, ze kterého L-tyrosin vzniká. Na tuto reakci katalyzovanou FAH navazuje přeměna L-tyrosinu na tyramin za katalýzy analogem AADC – enzymem L-tyrosin karboxylyasa (karboxyl štěpící, tvořící tyramin) (tyrosin dekarboxylasa, TD, EC 4.1.1.25). Následně je syntetizován oktopamin za přítomnosti enzymu tyramin, askorbát:kyslík oxidoreduktasa (β-hydroxylující) (tyramin β-hydroxylasa, TBH, EC 1.14.17.-) (Monastirioti *et al*., 1996; Cole *et al*., 2005; Verlinden *et al*., 2010; Obr. 11). Důležitým regulačním uzlem v biosyntéze oktopaminu je přeměna L-tyrosinu na tyramin. Pokud je snížena či inhibována aktivita TD, dochází k významnému snížení až vymizení obou neurotransmiterů (tyraminu a oktopaminu) – jedinci s velmi nízkou hladinou těchto molekul poté vykazují sníženou pohyblivost a úspěšnost při páření (vliv oktopaminu na kladení vajíček u samiček – viz kapitola 4.2.3.2) (Monastirioti *et al*., 1996; Cole *et al*., 2005; Verlinden *et al*., 2010).



Obrázek 11: Schéma biosyntézy a degradace oktopaminu v těle hmyzu a dalších bezobratlých organismů (TD – tyrosin dekarboxylasa; FAH – fenylalanin-4-monooxygenasa; TBH – tyramin β-hydroxylasa; AANAT – arylalkylamin *N*-acetyltransferasa); upraveno z Verlinden *et al*., 2010.

Degradace či inaktivace oktopaminu souvisí s jeho *N*-methylací, *γ*-glutamylací a spojením s β-alaninem nebo sulfátem (Blenau, 2005). Jako hlavní enzym účastnící se tohoto procesu lze označit enzym acetyl-CoA:2-arylethylamin *N*-acetyltransferasa (arylalkylamin *N*-acetyltransferasa, AANAT, EC 2.3.1.87), přičemž jsou tvořeny metabolity oktopaminu jako je synefrin a N-acetyloktopamin, které je schopno tělo hmyzu vyloučit (Verlinden *et al*., 2010; Obr. 11).

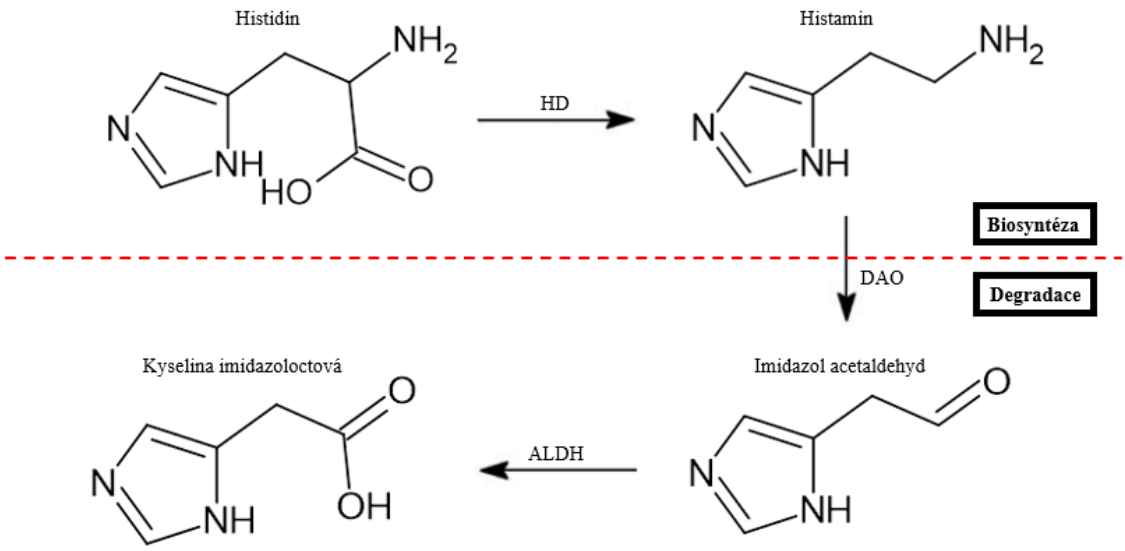
Z obrázků (Obr. 10 a 11) je zřejmá provázanost metabolismu dopaminu a oktopaminu. V závislosti na externích a interních stresorech jedince může být jednotlivá metabolická dráha upřednostňována, je také možná existence alternativní dráhy biosyntézy oktopaminu závislá na degradaci dopaminu, jehož biosyntéza probíhá v oblasti cerebrálního ganglionu hmyzu ve větší míře (Verlinden *et al*., 2010). Pro lepší pochopení je provázanost těchto dvou BAs vyobrazena na názorném schématu (Obr. 12).



Obrázek 12: Souhrnné schéma biosyntézy a degradace dopaminu a oktopaminu v těle hmyzu a dalších bezobratlých organismů (TD – tyrosin dekarboxylasa; TH – tyrosin-3-monooxygenasa; FAH – fenylalanin-4-monooxygenasa; TBH – tyramin β-hydroxylasa; AANAT – arylalkylamin *N*-acetyltransferasa; AADC – dekarboxylasa aromatických aminokyselin; NBAD – N-β-alanyldopamin; CLP – „cross-linked product" – zesíťovaný produkt degradace dopaminu vedoucí ke sklerotizaci kutikuly; NADA – N-acetyldopamin; DANADB – 2-(3´, 4´-dihydroxyfenyl)-3-acetylamino-6-(N-acetyl-2´-aminoethyl)-2,3-dihydro-1,4-benzodioxin – produkt degradace dopaminu vedoucí také ke sklerotizaci kutikuly); upraveno z Andersen, 2010 a Verlinden *et al*., 2010.

4.3.3 HISTAMIN

Biosyntéza histaminu je založena pouze na jednokrokové reakci přeměny AMK histidinu na aktivní BA (Blenau a Baumann, 2001). Dekarboxylační reakce je katalyzována enzymem L-histidin karboxylyasa (karboxyl štěpící, tvořící histamin) (histidin dekarboxylasa, HD, EC 4.1.1.22) (Burg *et al*., 1993; Obr. 13). V těle hmyzu nemá funkci hlavního mediátoru alergické a zánětlivé reakce jako je tomu u obratlovců, nýbrž po svém uvolnění z fotosenzitivních buněk jedince nacházejících se v optickém laloku cerebrálního ganglionu reguluje přenos signálu ze světelných a mechanických podnětů (Buchner *et al*., 1993; Melzig *et al*., 1996; Akashi *et al*., 2018).



Obrázek 13: Schéma biosyntézy a degradace histaminu v těle hmyzu a dalších bezobratlých organismů (HD – histidin dekarboxylasa; DAO – diamin oxidasa; ALDH – aldehyddehydrogenasa); upraveno podle Comas-Basté *et al*., 2020.

Hlavním inaktivačním a degradačním enzymem histaminu uvnitř organismu bezobratlých je enzym zastávající podobnou funkci jako lidská histamin:kyslík oxidoreduktasa (deaminující) (diamin oxidasa, DAO, EC 1.4.3.22), jež reguluje transformaci histaminu na imidazol acetaldehyd, který může být následně oxidován enzymem aldehyd:NAD^+ oxidoreduktasa (aldehyddehydrogenasa, ALDH, EC 1.2.1.3) na imidazoloctovou kyselinu, která je vyloučena z těla pomocí Malpighických trubic (Comas-Basté *et al*., 2020; Obr. 13).

4.4 Vývoj a pohled na metody stanovení BAs

V minulosti bylo přistupováno k stanovování BAs různými způsoby, při kterých bylo využíváno rozličného množství laboratorních metod a technik. V následující kapitole jsou shrnuty hlavní a osvědčené přístupy stanovování BAs od samotného zpracování vzorku až po jejich detekci a kvantifikaci.

4.4.1 EXTRAKCE Z BIOLOGICKÉHO VZORKU

Extrakce je prováděna za účelem přenosu co nejvyššího procentuálního obsahu zkoumaného analytu z biologického materiálu do vhodného extrakčního činidla. V případě izolace BAs z různých tkání druhu *Apis mellifera* se jedná o extrakci z pevné látky (biologického materiálu) do kapaliny (extrakčního činidla). Právě vhodná volba extrakčního činidla při homogenizaci biologického materiálu je klíčová pro vysokou výtěžnost celého extrakčního postupu a v průběhu let bylo v souvislosti s vývojem separačních a kvantifikačních technik popsáno značné množství extrakčních činidel pro izolaci BAs z různých tkání hmyzu – tato kapitola popisuje výčet těch nejpoužívanějších.

Izolace BAs využívající silných kyselin – především kyselinu chlorovodíkovou (HCl) a kyselinu chloristou ($HClO_4$) – rozpuštěných ve vodě v různých molárních koncentracích (nejpoužívanější koncentrace 0,1 $mol.dm^{-3}$ a 0,2 $mol.dm^{-3}$) je prováděna hlavně v experimentech stanovování BAs v biologickém materiálu s využitím elektrochemické detekce (ECD). Volba silných kyselin zajišťuje protonaci BAs, což způsobí jejich snadnější rozpustnost v prostředí polárního rozpouštědla (Carter *et al*., 1982). Dále kyselé prostředí umožní spolehlivou precipitaci proteinů v biologickém vzorku, přičemž navazující postup zahrnující kapalinovou či plynovou chromatografii (LC a GC) s následnou ECD poskytuje uspokojivou separaci BAs od balastních látek a jejich kvantifikaci (Evans *et al*., 1985; Watson *et al*., 1993; Harano *et al*., 2008; Cook *et al*., 2017; Bedia Erim, 2013; Hewlett *et al*., 2018).

Dalšími extrakčními činidly hmyzích BAs, které jsou používány v kombinaci s modernější instrumentací pro jejich kvantifikaci, jsou alkoholy (methanol (MeOH), ethanol (EtOH) a isopropanol (IsoP)), dále kyselina mravenčí (anglicky „formic acid“, neboli FA) v nízké objemové procentuální koncentraci (v/v) rozpuštěná ve vodě a také acetonitril (AcN). Kombinování jednotlivých extrakčních činidel a jejich v/v je možno adaptovat v závislosti na vlastnostech extrahovaných molekul (Molognoni *et al.,* 2018). Ve velkém množství publikací figuruje jako hlavní zástupce alkoholových extrakčních

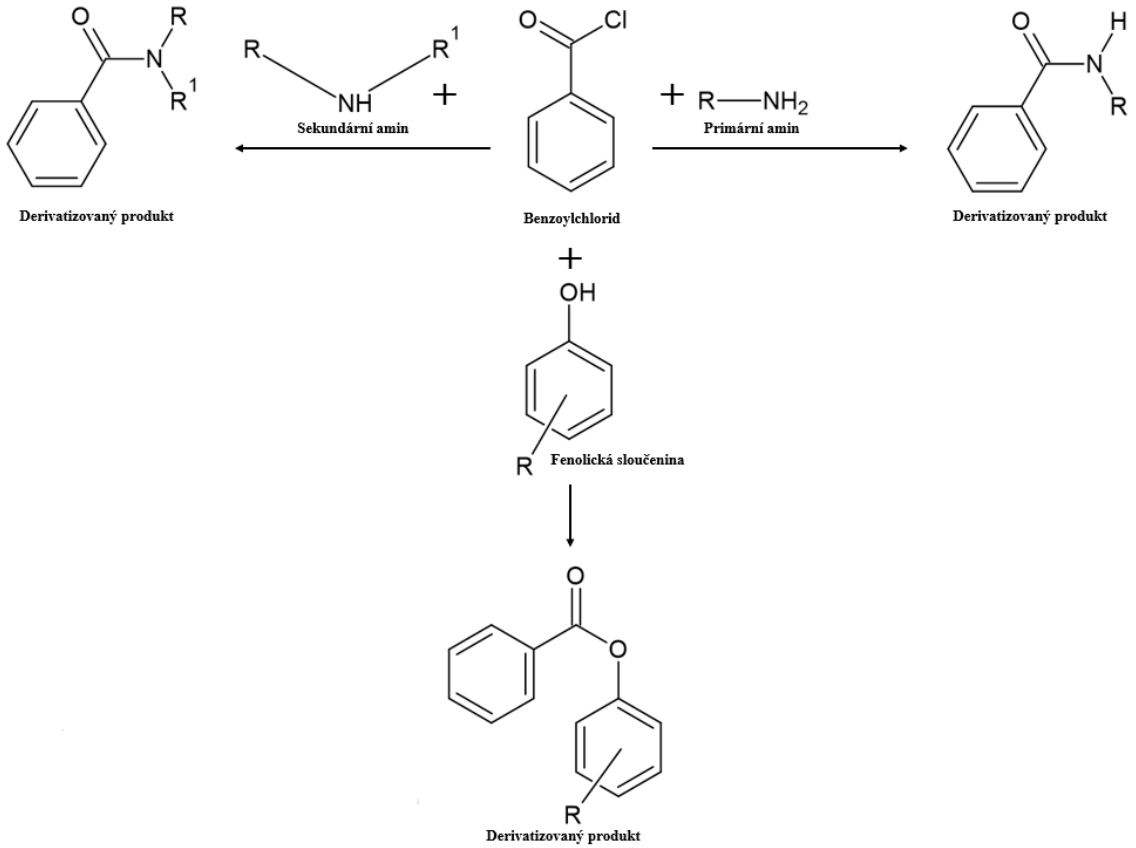
činidel MeOH, nejspíše kvůli jeho nejnižšímu bodu varu z uvedených tří alkoholů a také proto, že se jednotlivé alkoholy mohou lišit svou extrakční účinností (Bedia Erim, 2013; Pawar *et al*., 2014; Wade, 2023). Při extrakci v alkoholech je velmi vhodné pracovat ve vysoké objemové procentuální koncentraci alkoholu s přídavkem kyseliny (obvykle použita v/v kyseliny pohybující se do 1 %), jež způsobuje posun pH směsi do kyselé oblasti, což má kladný vliv na precipitaci proteinů a rozpustnost BAs v polárním prostředí (Carter *et al*., 1982). Mimoto bylo zjištěno, že posun pH vzorku BAs do kyselé oblasti kladně ovlivňuje stabilizaci dopaminu, jenž má tendenci v neutrálním a zásaditém pH podléhat autooxidaci (Umek *et al*., 2018). Proto jsou ve většině experimentů zahrnující extrakci v MeOH použity zároveň kyseliny v nízké objemové procentuální koncentraci – zejména kyselina trifluoroctová (TFA) a FA (Barnes *et al*., 2009; Zhang *et al*., 2020). Na podobném principu je založena i extrakce ve vodě s přídavkem FA. Při volbě AcN pro extrakci a následné i pro směs tvořící mobilní fázi chromatografické separace je přihlíženo na jeho chemické vlastnosti odlišující se od MeOH. Nejdůležitějšími vlastnostmi v rámci porovnání účinnosti AcN a MeOH při extrakci a separaci BAs jsou dipólový moment, kyselost a bazicita. AcN disponuje vyšším dipólovým momentem a vykazuje spíše kyselý charakter, kdežto MeOH má nižší dipólový moment a figuruje jako příjemce vodíkové vazby – má bazický charakter (Taylor, 2014). AcN je také volen pro svou nižší hodnotu „cut-off“, nižší viskozitu ve směsi s vodou a vyšší bod varu ve srovnání s MeOH (Taylor, 2014). Stejně jako MeOH je používán při stanovení analytů různého charakteru (García-Valcárcel a Tadeo, 2009; Pizzutti *et al*., 2009; Tanner a Czerwenka, 2011; Du *et al*., 2022).

4.4.2 DERIVATIZACE VZORKU

S vývojem LC-MS vznikla v průběhu nedávných let velmi přesná a spolehlivá metoda stanovení BAs. LC-MS metodou je možno separovat širokou škálu analytů izolovaných z biologických materiálů, nicméně značnou komplikací při samotné detekci je velké množství polárních sloučenin, které jsou v biologické matrici obsaženy (Grinias *et al*., 2017). Tyto sloučeniny se ve vzorku nachází i po provedení extrakce, proto je nutno provést po extrakci následné purifikační a separační kroky za účelem přečištění vzorku před samotnou LC-MS analýzou. Kromě separačních metod zahrnující extrakci na pevnou fázi (anglicky „solid phase extraction“, neboli SPE) či extrakci kapalinou (anglicky „liquid-liquid extraction“, neboli LLE) (viz kapitola 4.4.3) je možno BAs

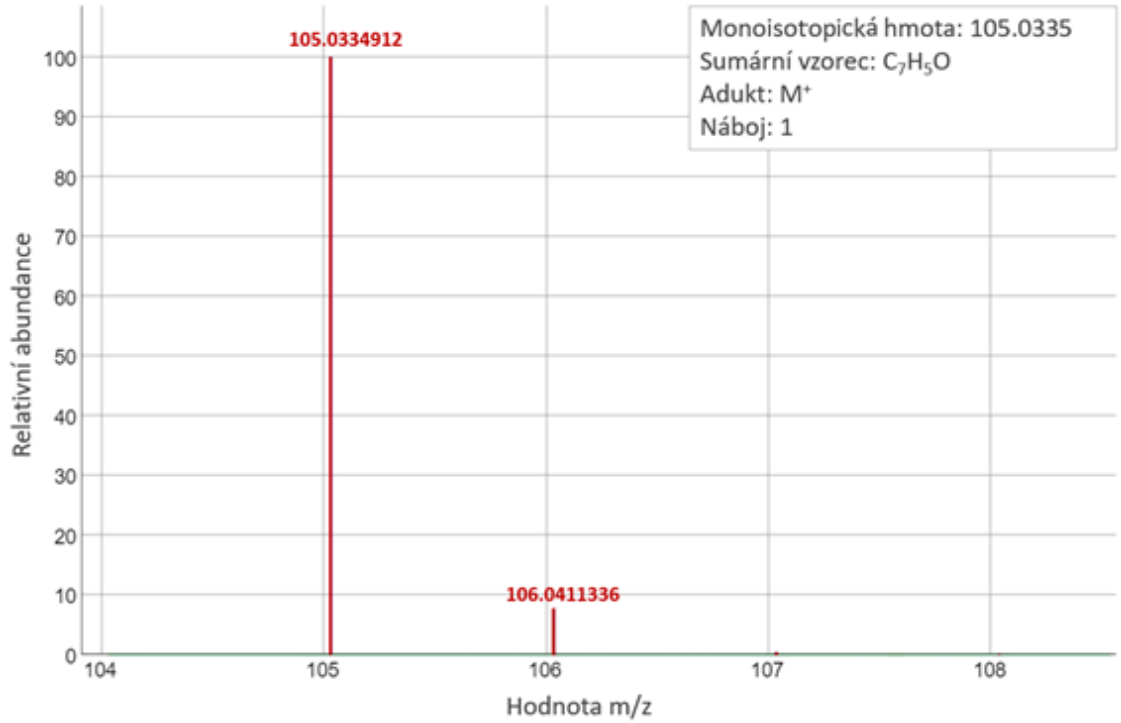
separovat z komplexního vzorku pomocí derivatizace, při které dochází ke značnému zvýšení selektivity a citlivosti metody (Özdestan a Üren, 2009; Grinias *et al*., 2017).

Existuje několik derivatizačních činidel, mezi nejvíce používaná je řazen benzoylchlorid (BzCl), *o*-ftalaldehyd (OPA), dansylchlorid, formaldehyd, ethylchloroformát a anhydrid kyseliny propionové (Özdestan a Üren, 2009; Grinias *et al*., 2017; Zestos a Kennedy, 2017). Po navázání nepolární skupiny derivatizačního činidla na strukturu BAs dochází při chromatografické separaci v reverzní fázi (anglicky „reversed-phase liquid chromatography“, neboli RP-LC) k výraznému zvýšení retence vzniklé sloučeniny v chromatografické koloně. Tento fakt je žádoucí, jelikož dojde k separaci derivatizovaných vzorků od značného počtu vysoce polárních sloučenin, které jsou eluovány spolu se solemi způsobujícími matricové interference snižující efektivitu ionizace hmotnostního spektrometru (Grinias *et al*., 2017). Při derivatizaci dochází navázáním derivatizačního činidla také ke změně molekulové hmotnosti, a tedy i k změně hodnoty m/z jednotlivých BAs, která je oproti původní hodnotě vyšší. V hmotnostním spektru lze následně pozorovat fragment způsobený odštěpením derivatizačního činidla od BA v hmotnostním spektrometru – tento fragment má typickou hodnotu m/z v závislosti na použitém derivatizačním činidle (Grinias *et al*., 2017). Özdestan a Üren (2009) ve své práci popsali srovnání derivatizačních činidel BzCl, OPA a dansylchloridu, přičemž z těchto tří činidel uvedli jako nejvhodnější BzCl z důvodu jeho relativně krátkého elučního času, stability, snadné dostupnosti a ekonomického pohledu. BzCl interaguje s většinou přirozeně se vyskytujících primárních i sekundárních BAs a fenolickými látkami za tvorby světelně stabilních derivátů (Karovičová a Kohajdová, 2005; Özdestan a Üren, 2009; Obr. 14).



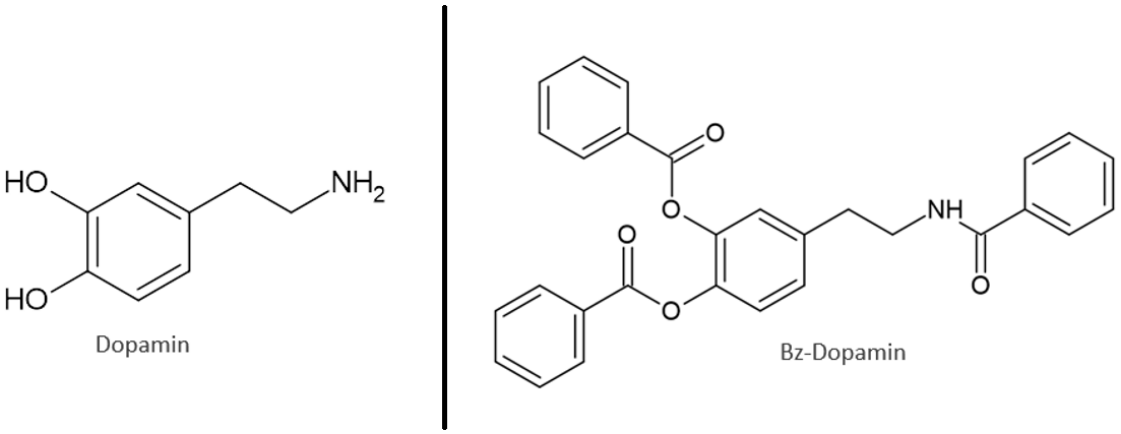
Obrázek 14: Obecné reakční schéma derivatizace primárních aminů, sekundárních aminů a fenolických sloučenin za účasti BzCl. Vytvořeno v programu ChemSketch.

Hodnota m/z typická pro fragment BzCl je 105,0335 – pomocí této hodnoty lze v hmotnostním spektru identifikovat derivatizované analyty (Grinias *et al*., 2017; PubChem, 2023b; Obr. 15). Dopamin a oktopamin obsahují ve své struktuře kromě primárních aminových skupin i volné hydroxylové skupiny v konjugaci s šestičlenným aromatickým cyklem, nicméně nejvíce preferována je benzoylační reakce právě s primární aminovou skupinou. Histamin obsahuje sekundární aminovou skupinu, ta je ale součástí pětičlenného konjugovaného aromatického cyklu, tudíž na ní navázání BzCl pravděpodobně nebude také preferováno (Grinias *et al*., 2017).



Obrázek 15: Hmotnostní spektrum fragmentu benzoylchloridu (BzCl) s vyobrazenou nejvíce zastoupenou hmotou (hodnota m/z = 105,0335); upraveno z platformy enviPat Web (Loos *et al*., 2015; URL webu: https://www.envipat.eawag.ch/index.php).

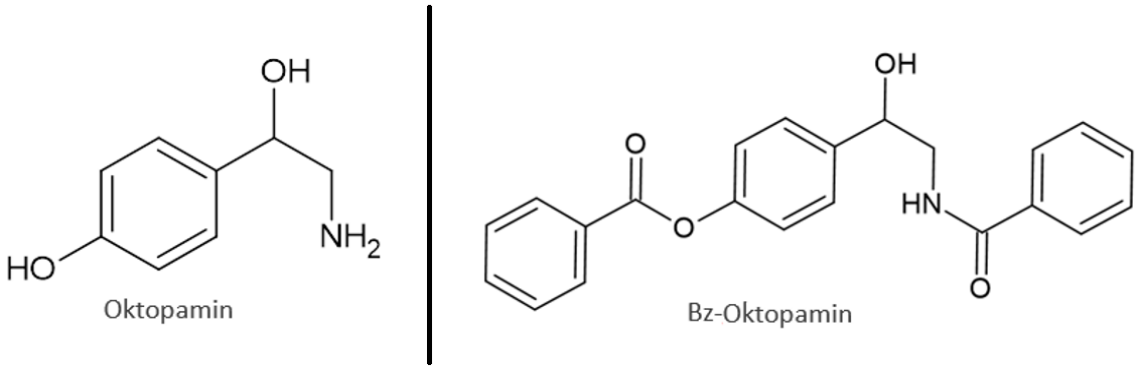
Při reakci dopaminu s BzCl bude pravděpodobně docházet v pozitivním módu měření hmotnostního spektrometru k posunu m/z hodnoty z původního prekurzorového iontu 154,0863, respektive z jeho hlavního fragmentu 137,08355 na hodnotu 466,1649 (adukt s H^+), či 483,1676 (adukt s vodou), což je zřetelně pozorovat ze strukturního vzorce dopaminu před a po benzoylační reakci (enviPat Web – Loos *et al*., 2015; PubChem, 2023a; Obr. 16).



Obrázek 16: Srovnání strukturního vzorce dopaminu (vlevo) a benzoylovaného dopaminu (Bz-Dopamin; vpravo); vytvořeno v programu ChemSketch.

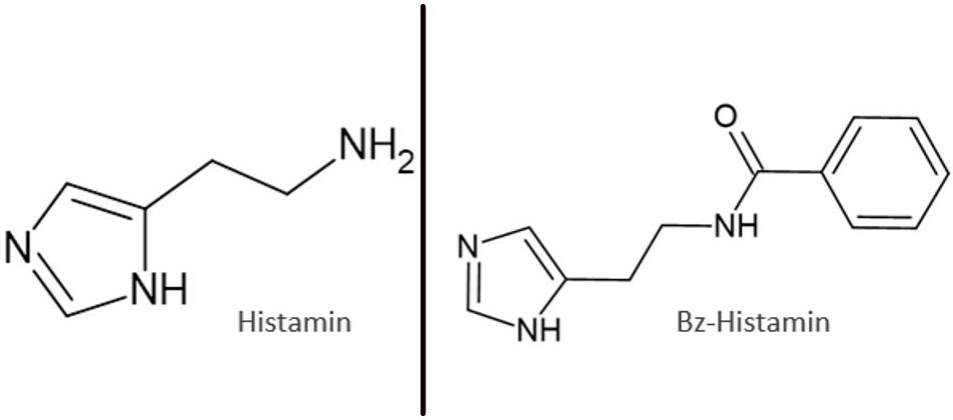
Za stejných podmínek bude po derivatizační reakci oktopaminu s BzCl patrná změna hodnoty m/z, která vzroste z původní hodnoty typu prekurzorového iontu 136,0757, od

kterého byla odštěpena voda, na hodnotu m/z 362,1387 (adukt s H^+), či 344,1281 (adukt, od kterého byla také odštěpena molekula vody), jak je patrné ze strukturních vzorců oktopaminu a jeho analogu po derivatizační reakci s BzCl (enviPat Web – Loos *et al.*, 2015; PubChem, 2023c; Obr. 17).



Obrázek 17: Srovnání strukturního vzorce oktopaminu (vlevo) a benzoylovaného oktopaminu (Bz-Oktopamin; vpravo); vytvořeno v programu ChemSketch.

Po derivatizační reakci histaminu s BzCl bude docházet při nastavení hmotnostního spektrometru na pozitivní mód měření k navýšení hodnoty m/z prekurzorového iontu 112,0869 na 216,1131 (adukt s H^+). Ze strukturních vzorců histaminu a jeho derivatizovaného aduktu lze odvodit změnu v hodnotě m/z (enviPat Web – Loos *et al.*, 2015; PubChem, 2023d; Obr. 18).



Obrázek 18: Srovnání strukturního vzorce histaminu (vlevo) a benzoylovaného histaminu (Bz-Histamin; vpravo); vytvořeno v programu ChemSketch.

Malec (2018) ve své práci uvádí hodnoty m/z pro jednotlivé BAs, které korespondují s výše uvedenými zjištěnými hodnotami, přičemž pro každý analyt bude v experimentální části vybrán z hmotnostního spektra odpovídající iont s nejvyšší intenzitou hodnoty m/z.

Reakce vzorku s BzCl (neboli benzoylační reakce) je řazena do Schotten-Baumannových reakcí používaných pro esterifikaci a amidaci acylchloridů, jež je rychlá, může být praktikována při laboratorní teplotě a takto vzniklé produkty jsou

právě při laboratorní teplotě stabilní až týden, při zamražení na -80 °C mohou být benzoylované vzorky stabilní po dobu až šesti měsíců (Baumann, 1886; Song *et al*., 2012; Wong *et al*., 2016; Grinias *et al*., 2017). Samotný postup derivatizační reakce s BzCl má několik kroků. Nejprve je nutný posun pH směsi vzorku do bazické oblasti, jelikož benzoylační reakce vyžaduje pH reakce nejméně 9 (Grinias *et al*., 2017). Wong *et al*. (2016) ve své studii uvádí, že v současnosti nejvíce používaným a zároveň velmi šetrným činidlem pro navýšení hodnoty pH vzorků různých analytů je uhličitan sodný (Na_2CO_3), samotný autor ve svém experimentu použil Na_2CO_3 o koncentraci 0,1 mol.dm^{-3}. Dalším krokem je přidání roztoku BzCl v AcN (většinou používaná v/v 2% BzCl v AcN), které iniciuje derivatizační reakci – ta je poté ukončena přidáním směsi interních standardů (IS*) rozpuštěných v AcN (20% v/v) a kyselině sírové (1 % w/w). Ke vzorku je také možno přidat určitý objem vody za účelem snížení obsahu organických sloučenin ve vzorku, což má velký vliv na celou analýzu (Wong *et al*., 2016; Grinias *et al*., 2017). Celý derivatizační postup je velmi jednoduchý a časově nenáročný, nicméně pro jeho lepší pochopení je uveden na schématu (Obr. 19).

Obrázek 19: Zjednodušené schéma pracovního postupu derivatizace analyzovaného vzorku pomocí BzCl (IS* – směs interních standardů rozpuštěných v 0,1% FA; Na_2CO_3 – uhličitan sodný; BzCl – benzoylchlorid; H_2SO_4 – kyselina sírová); upraveno podle Grinias *et al*., 2017.

4.4.3 SEPARAČNÍ METODY

Široce využívanou technikou pro separaci molekul je LLE založená na použití dvou nemísitelných kapalin – obvykle na bázi vodného a organického charakteru. Pro separaci různých analytů je možné tyto dvě kapaliny adaptovat a měnit za účelem co nejvyššího výtěžku separace. Při samotné separaci dochází k přenosu analytu z jeho zásobního roztoku do vhodně zvoleného rozpouštědla nemísitelného se zásobním roztokem pomocí důkladného promíchání a opětovného rozdělení dvou nemísitelných kapalných fází (Aurora Biomed Inc., 2022). Volba rozpouštědla je závislá na jeho schopnosti extrakce analytu ze zásobního roztoku, dále je důležité, aby rozpouštědlo nepodléhalo korozi a mělo uspokojivou návratnost pro daný analyt. Zároveň musí být zachováno povrchové napětí mezi kapalinami, kdyby totiž bylo povrchové napětí příliš nízké, nedocházelo by

k opětovnému úplnému rozdělení dvou kapalných fází a separace by byla nedostatečně úspěšná – docházelo by ke značným ztrátám analytu (Aurora Biomed Inc., 2022). Tento typ separační metody lze provádět klasickým způsobem vytřepávání dvou kapalin v uzavřené nádobě, dále v malém měřítku (mikroseparace) s využitím dalšího přístroje (centrifuga) za účelem zvýšení přesnosti celého procesu a také ve velkém měřítku za využití automatizovaných extrakčních přístrojů (Aurora Biomed Inc., 2022).

SPE je při srovnání s LLE odlišná způsobem separace analytu z jeho zásobního roztoku. Analyt je v průběhu SPE separován od směsi ostatních molekul interakcí kapalné mobilní fáze (MF) nesoucí analyt se stacionární fází (SF) v pevném skupenství. SPE je rozdělena na tři základní typy podle principu separace – SPE v normální fázi (pro polární molekuly), v reverzní fázi (pro nepolární molekuly) a iontově výměnná (pro nabité molekuly). Volba MF a odpovídající SF souvisí s vlastnostmi analytu, který je separován a stanovován – nejprve musí být analyt v pevném skupenství rozpuštěn v MF, která je nanesena na SF a působení pozitivního, či negativního tlaku zajišťuje jejich interakci. V závislosti na chemických, nebo elektrostatických interakcích jednotlivých molekul ze vzorku se SF dochází k jejich neprostoupení, či zpomalení a eluci v čase odpovídajícímu jejich afinitě k SF. Na základě eluce analytu v konkrétním čase ho lze izolovat od ostatních komponent vzorku a samostatně ho detekovat a kvantifikovat (Aurora Biomed Inc., 2022). Existuje mnoho SPE náplní (anglicky „cartridges“, SPEc), které jsou používány v laboratořích za účelem rychlé jednokrokové separace. SPEc jsou děleny do skupin klasických SPEc, SPEc s navázaným C8, či C18 silikagelem, SPE disky a SPE v mikroextrakčním provedení – stejně jako LLE je možno kombinovat SPE například s centrifugou (Hawach Scientific, 2021). Izolace některých molekul vyžaduje komplexnost separačního postupu a provedení několika opakování SPE, tudíž tato separace může být časově náročná, nicméně SPE oproti LLE poskytuje výhody, jakými jsou odstranění tvorby případné emulze smícháním dvou kapalin a kvantitativní návratnost separace (Aurora Biomed Inc., 2022). SPE i LLE ovšem mohou být vhodnými prepurifikačními kroky před samotnou analýzou komplexních vzorků (například vzorky různých potravin) pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (anglicky „high-performance liquid chromatography“, HPLC) (Hornero-Méndez a Garrido-Fernández, 1994; Shalaby, 1995; Moret a Conte, 1996; Vale a Glória, 1997; Lange *et al*., 2002).

HPLC separace funguje na principu analogickém s principem SPE – může probíhat v klasickém uspořádání, tedy v normální fázi (HPLC), následně v reverzní fázi

(RP-HPLC) a na iontoměničích (IEC) – nicméně se vyznačuje mnohými výhodami. Jednou z hlavních výhod je velikost částic SF, kdy při SPE jsou částice větší až čtyřikrát oproti HPLC (až 40 μm u SPE oproti 3 až 10 μm u HPLC), efektivita separační schopnosti SF tudíž výrazně roste, další důležitou výhodou HPLC separace je počet separačních vrstev (teoretických pater chromatografické kolony). Uvedené vlastnosti oddělení jednotlivých molekul pomocí HPLC způsobují, že účinnost separace pomocí SPE je oproti HPLC výrazně nižší a pomocí SPE je možno oddělit pouze molekuly s vysoce rozdílnými vlastnostmi, při použití HPLC separace tedy současně s účinností separace výrazně roste i její specifita (Hawach Scientific, 2021).

4.4.4 DETEKČNÍ A KVANTIFIKAČNÍ METODY

Od představení detektoru pracujícího na elektrochemickém principu v roce 1973 prošla kvantifikační metoda ECD značnými změnami a v kombinaci se separační metodou využívající HPLC došlo postupně k vývoji velmi citlivé stanovovací metody BAs (Kissenger *et al*., 1973; Westerink, 2000; HPLC-ECD). Samotný detektor byl původně složen z tenkostěnných komor vyplněných uhlíkovou pastou, která byla později nahrazena skelným uhlíkem, přičemž jako první byly tyto detektory samostatně produkovány společností BioAnalytical Systems (BASi®) (Westerink, 2000). Tento detektor následně působí oxidaci, či redukci analytu a odpovídající změna proudu je detekována a vyhodnocena – takový detektor je nazýván amperometrický. Dalšími typy detektorů jsou konduktometrický (měřena konduktivita na různých hladinách frekvence) a potenciometrický (měřen rozdíl elektrických potenciálů referenční a měřící elektrody) (Stradiotto *et al*., 2003). Speciální aplikace ECD od společnosti BASi® spočívala v tak zvaném „redox-módu“, při kterém docházelo k oxidaci a vzápětí k redukci analytu. Při zpětné oxidaci BAs je možno dané molekuly detekovat ještě s vyšší selektivitou (Westerink, 2000).

S rozvojem hmotnostní spektrometrie (anglicky „mass spectrometry“, neboli MS) dochází ke stále častějšímu využívání kombinace HPLC metody v kombinaci s MS pro detekci a kvantifikaci BAs (de Jong *et al*., 2011; Bedia Erim, 2013; Zhang *et al*., 2020; HPLC-MS). Oproti HPLC-ECD poskytuje HPLC-MS metoda řadu výhod, jakými jsou zejména zkrácení času analýzy, odstranění interferencí mezi analyty, schopnost vysoké analytické výkonnosti a široká rozmanitost vzorků, jež mohou být stanovovány. Mimoto má HPLC-MS oproti HPLC-ECD metodě nižší limit detekce, vyšší specifitu a také selektivitu při detekci a kvantifikaci BAs a jiných metabolitů s obecně nízkou koncentrací

ve vzorku. U HPLC-MS metody je navíc možno dosáhnout ještě nižšího limitu detekce, vyšší citlivosti, specifity a přesnosti využitím hybridní (či tandemové) hmotnostní spektrometrie (MS/MS), jež využívá sériové propojení více hmotnostních analyzátorů. Analyzátory typu kvadrupól (Q), „time-of-flight“ (TOF), iontová past (TRAP) a jiné mohou následně tvořit hybridní analyzátory – trojitý Q (QqQ), Q propojený s TRAP (Q-TRAP), či s TOF analyzátorem (Q-TOF) a další – tímto propojením vzniká HPLC-MS/MS. „On-line“ uspořádání (možnost strojového propojení HPLC a MS/MS) a specifická příprava vzorku pro HPLC-MS/MS analýzu umožňuje také reprodukovatelné a efektivní zacházení s velkým množstvím vzorků při objemnějších analýzách, přičemž je při kvantifikaci používáno přidání určitého množství IS*, které se od původních molekul liší v izotopovém zastoupení prvků – v hmotnostním spektru je tedy možné IS* rozlišit od stanovovaných analytů (de Jong *et al*., 2011).

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Materiál

5.1.1 BIOLOGICKÝ MATERIÁL A CHEMIKÁLIE

5.1.1.1 Biologický materiál

Biologický materiál představovaly včely druhu *Apis mellifera*, konkrétně dělnice různého stáří, které byly dodány vedoucím práce. Včely, dříve usmrcené v kapalném dusíku, byly podrobeny disekci a rozděleny na hlavovou část, hruď a zadeček. Ze zadečkové části byl následně vypreparován trávicí trakt včely (TT; složen ze žaludku a střeva), který byl oddělen od jedové žlázy a žihadla. Hlavová část, TT, jedová žláza a případně i samotný jed byly podrobeny analýze.

5.1.1.2 Chemikálie

Acetonitril MS kvality (Fisher Chemical, Thermo Fisher Scientific, USA)

Benzoylchlorid 99% (Sigma-Aldrich®, USA)

Deuterované interní standardy dopaminu (dopamin-D_4) a histaminu (histamin-D_4) (Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Velká Británie, USA)

Isopropanol MS kvality (Fisher Chemical, Thermo Fisher Scientific, USA)

Kyselina chloristá 70% (Sigma-Aldrich®, USA)

Kyselina mravenčí 99,5% MS kvality (Fisher Chemical, Thermo Fisher Scientific, USA)

Kyselina sírová 96% (Lach-Ner, s.r.o., Česká republika)

Kyselina trifluoroctová 99% (Sigma-Aldrich®, USA)

Methanol MS kvality (Fisher Chemical, Thermo Fisher Scientific, USA)

Mravenčan amonný 97% (Sigma-Aldrich®, USA)

Standard dopaminu (dopamin hydrochlorid), oktopaminu (oktopamin hydrochlorid) a histaminu (histamin dihydrochlorid) (Sigma-Aldrich®, USA)

Uhličitan sodný (Lach-Ner, s.r.o., Česká republika)

Voda MS kvality (Sigma-Aldrich®, USA)

5.1.2 LABORATORNÍ POMŮCKY A PŘÍSTROJE

Analytické váhy (BioTech, USA)

Automatické pipety (Eppendorf, Německo)

C18 SPE disky (Thermo Fisher Scientific, USA)

Centrifuga 5424 R (Eppendorf, Německo)

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

Hmotnostní spektrometr MS/MS compact Q-TOF (Bruker Daltonik, Německo)

Homogenizátor Fast Prep FP120 (Thermo Fisher Scientific, USA)

Chromatografická kolona ARION® Polar C18 (pH mezi 1,5 a 7; 150 x 2,1 mm; velikost částic 2,2 µm; maximální tlak 650 bar; průtok 300 µl/min) (Chromservis, s.r.o., Česká republika)

Chromatografická kolona RAPTOR C18 (pH mezi 2 a 8; 100 x 2,1 mm; velikost částic 2,7 µm; maximální tlak 600 bar; průtok 300 µl/min) (Restek, USA)

Mikrozkumavky 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml a špičky na pipetování (Eppendorf, Německo)

Program OTOF Control k řízení hmotnostního spektrometru (Bruker Daltonik, Německo)

Rotační koncentrátor, či vakuová odparka Speed Vac (Eppendorf, Německo)

Skleněné „total-recovery“ vialky (TRV) 2 ml (Agilent Technologies, Inc., USA)

Software Compass HyStar (Bruker Daltonik, Německo)

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

Software TASQ – verze 1.4 (Bruker Daltonik, Německo)

Ultrazvuková lázeň Elmasonic S 50 R (Elma®, Německo)

Víčka na „total-recovery“ vialky (Waters™, USA)

Vortex (Cole-Parmer®, Velká Británie)

5.2 Metody

Metodická část byla z důvodu větší přehlednosti rozdělena na dvě hlavní kapitoly, které korespondují s chronologickým postupem práce v laboratoři. Nejprve byla provedena analýza biologických vzorků bez jejich derivatizace (kapitola 5.2.1), následně byla změněna strategie pracovního postupu a byla provedena analýza biologických vzorků s jejich derivatizací (kapitola 5.2.2).

5.2.1 POSTUP ANALÝZY ZPRACOVÁNÍ BIOLOGICKÉHO VZORKU BEZ DERIVATIZACE

5.2.1.1 Příprava kalibrační křivky

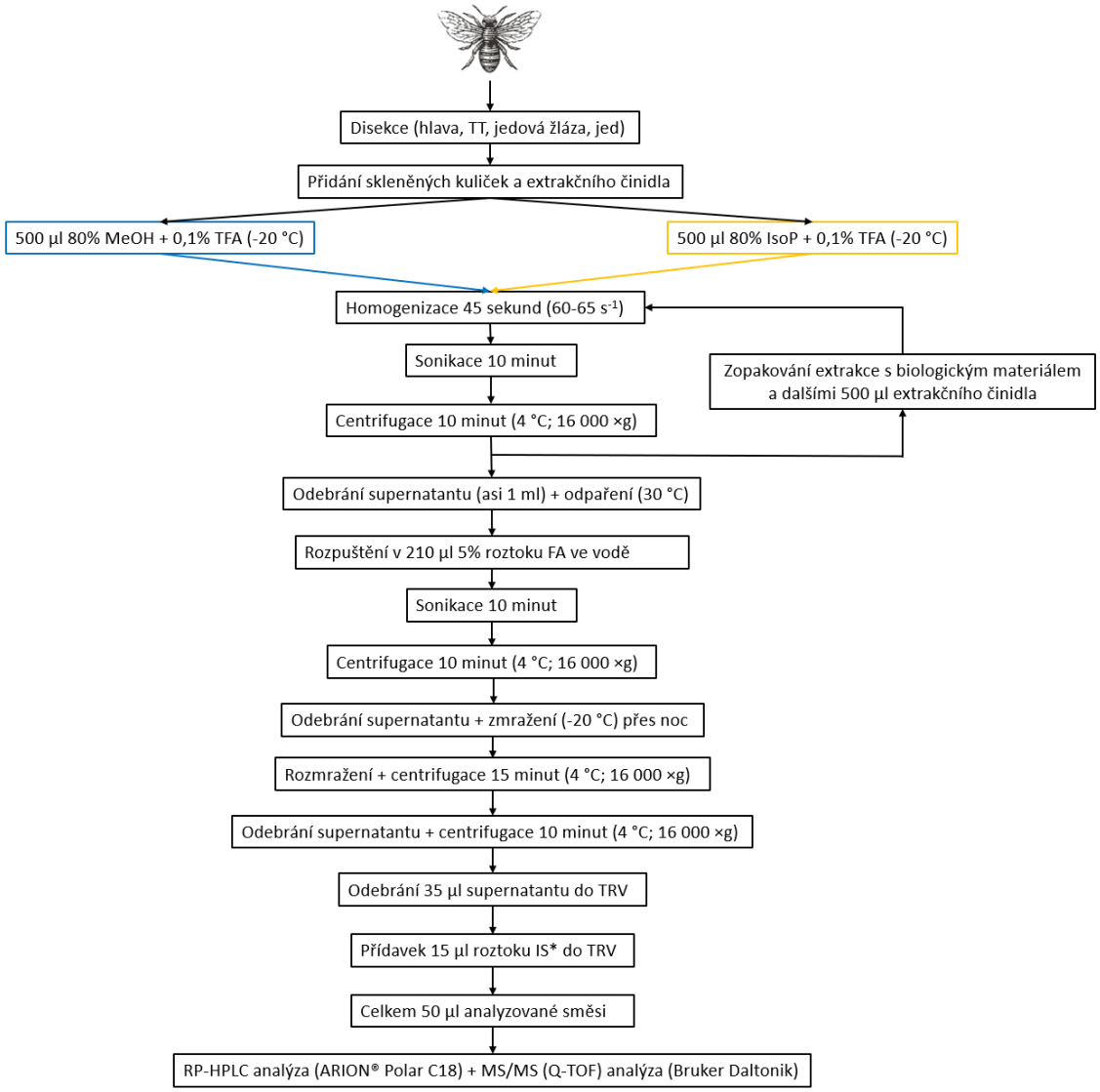
Byly připraveny dvě kalibrační křivky – jedna pro extrakci v 80% MeOH a 80% IsoP s 0,1% TFA, druhá pro extrakci v 0,2 mol.dm^{-3} $HClO_4$ ve vodě. Kalibrační křivka pro extrakci v MeOH a IsoP byla složena ze 16 bodů s konstantní koncentrací IS* dopaminu-D_4 (3 000 nmol.dm^{-3}) a histaminu-D_4 (30 000 nmol.dm^{-3}) a vzrůstající koncentrací standardů (STD) dopaminu, oktopaminu a histaminu (50, 75, 100, 250, 500, 750, 1 000, 1 500, 2 000, 3 000, 5 000, 6 000, 8 000, 10 000, 12 000 a 14 000 nmol.dm^{-3} pro dopamin a oktopamin, pro histamin byly koncentrace v každém kalibračním bodu desetinásobně vyšší ve srovnání s koncentrací dopaminu a oktopaminu). IS* i STD byly rozpuštěny ve vodě naředěny na koncentrace 100 µmol.dm^{-3} (v případě STD histaminu a IS* histaminu-D_4) a 10 µmol.dm^{-3} (v případě STD dopaminu a oktopaminu a IS* dopaminu-D_4). Dva vzniklé zásobní roztoky (STD a IS*) byly napipetovány do vialek. Poté byl obsah vialek včetně STD a IS* odpařen ve vakuové odparce při 30 °C a opětovně rozpuštěn ve 100 µl 0,1% FA.

Kalibrační křivka pro extrakci v 0,2 mol.dm^{-3} $HClO_4$ byla složena také ze 16 bodů s konstantní koncentrací IS* dopaminu-D_4 (3 000 nmol.dm^{-3}) a histaminu-D_4 (30 000 nmol.dm^{-3}) a vzrůstající koncentrací STD dopaminu, oktopaminu a histaminu ve vialkách. Zásobní roztoky IS* i STD byly pipetovány do vialek stejným způsobem jako při tvorbě kalibrační křivky pro extrakci v MeOH a IsoP. Po napipetování vzorků představující body kalibrační křivky byl obsah vialek odpařen ve vakuové odparce při 30 °C a následně rozpuštěn ve 100 µl 0,2 mol.dm^{-3} $HClO_4$ ve vodě.

5.2.1.2 Postup extrakce v 80% MeOH a 80% IsoP s 0,1% TFA

Extrakční postup je totožný pro MeOH i IsoP, liší se pouze v použití extrakčního činidla. Nejprve bylo do 2 ml mikrozkumavky k vybrané zmražené části těla včely medonosné přidáno několik skleněných kuliček a 500 µl vychlazeného (-20 °C) 80% MeOH (80%

IsoP) s 0,1% TFA. Takto připravený vzorek byl přesunut do homogenizátoru a homogenizován po dobu 45 sekund na nejvyšší možnou rychlost přístroje (frekvence 60-65 s^{-1}). Homogenizovaný vzorek byl poté sonikován po dobu 10 minut a následně centrifugován za snížené teploty (4 °C) po dobu 10 minut při přetížení 16 000 ×g. Supernatant byl po centrifugaci odebrán do čisté 2 ml mikrozkumavky. S usazeným biologickým materiálem po proběhlé extrakci byl tento extrakční postup zopakován s dalšími 500 µl vychlazeného (-20 °C) 80% MeOH (80% IsoP) a 0,1% TFA za účelem zvýšení výtěžku celého izolačního postupu. Supernatant z druhé extrakce byl přidán k supernatantu z první extrakce do 2 ml mikrozkumavky a takto vzniklý extrakt byl zkoncentrován jeho odpařením při 30 °C (asi 3 hodiny). Odparek byl následně resuspendován v 210 µl 5% FA, sonikován po dobu 10 minut a centrifugován po dobu 10 minut při teplotě 4 °C a přetížení 16 000 ×g. Supernatant byl přenesen do čisté 1,5 ml mikrozkumavky a takto připravený extrakt byl zamražen (-20 °C) přes noc. Následující den byl extrakt rozmražen a centrifugován 15 minut při teplotě 4 °C a přetížení 16 000 ×g. Supernatant byl odebrán a znova centrifugován za stejných podmínek, ovšem už jen 10 minut. Z takto připraveného vzorku bylo odebráno 35 µl a přeneseno do vialek. Do vialek bylo dále přidáno 15 µl dříve připraveného zásobního roztoku IS* o látkovém množství shodujícím se s látkovým množstvím IS* přidávaným do všech kalibračních bodů při tvorbě kalibrační křivky (výsledná množství dopaminu-D_4 30 pmol a histaminu-D_4 300 pmol na nástřik). Objem 50 µl takto nachystaného vzorku byl vložen do přístroje, kde probíhala jeho separace a kvantifikace pomocí HPLC-MS/MS metody. Schéma tohoto extrakčního postupu je shrnuto na obrázku (Obr. 20).

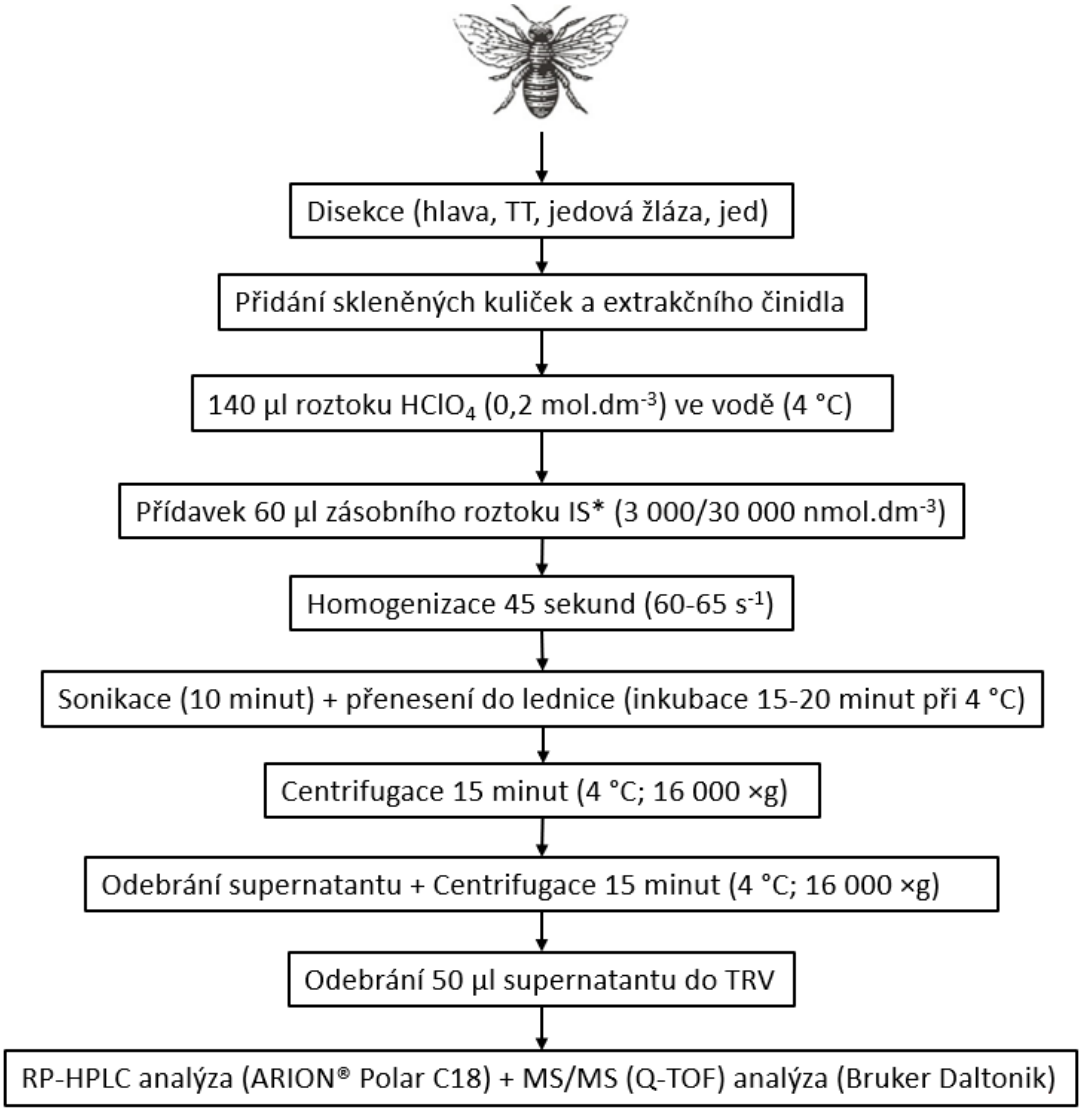


Obrázek 20: Schéma extrakčního postupu při extrakci vzorku v 80% MeOH a 80% IsoP s 0,1% TFA (TT – trávicí trakt; FA – kyselina mravenčí; TRV – „total-recovery“ vialky; IS* – interní standardy; RP-HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie v reverzní fázi; MS/MS – tandemová hmotnostní spektrometrie; Q-TOF – hybridní hmotnostní analyzátor složený z kvadrupólu a „time-of-flight“ analyzátoru); obrázek včely převzat z: Shutterstock, Inc., 2023.

5.2.1.3 Postup extrakce v 0,2 mol.dm^{-3} $HClO_4$

K biologickému vzorku v 2 ml mikrozkumavce byly přidány skleněné kuličky, 140 µl vychlazené (4 °C) 0,2 mol.dm^{-3} $HClO_4$ ve vodě a 60 µl zásobního roztoku IS* (výsledná množství dopaminu-D_4 30 pmol a histaminu-D_4 300 pmol na nástřik). Vzorek byl homogenizován 45 sekund při frekvenci homogenizátoru 60-65 s^{-1}. Homogenát byl sonikován 10 minut a přenesen do lednice, kde proběhla jeho inkubace po dobu 15-20 minut při 4 °C. Následně byl vzorek centrifugován 15 minut při teplotě 4 °C a přetížení 16 000 ×*g*. Supernatant byl přenesen do čisté 1,5 ml mikrozkumavky a centrifugace byla zopakována ještě jednou. Objem 50 µl přečištěného supernatantu byl

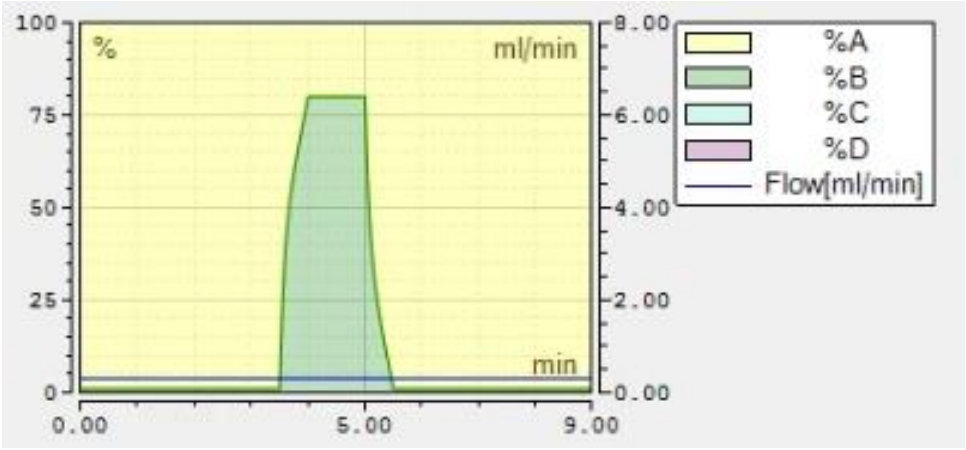
přepipetován do vialek a vzorek byl připraven na HPLC-MS/MS analýzu. Zmíněná extrakce je vyobrazena na schématu (Obr. 21).



Obrázek 21: Schéma extrakčního postupu při extrakci vzorku v 0,2 mol.dm^{-3} $HClO_4$ (TT – trávicí trakt; IS* – interní standardy; TRV – „total-recovery" vialky; RP-HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie v reverzní fázi; MS/MS – tandemová hmotnostní spektrometrie; Q-TOF – hybridní hmotnostní analyzátor složený z kvadrupólu a „time-of-flight" analyzátoru); obrázek včely převzat z: Shutterstock, Inc., 2023.

5.2.1.4 Chromatografická separace (ARION® Polar C18)

Chromatografická separace pomocí HPLC systému s nástřikem 10 µl a průtokem 0,3 ml.min^{-1} probíhala v reverzní fázi za využití chromatografické kolony ARION® Polar (2,2 µm, 150 mm × 2,1 mm). MF A byla tvořena z 95 % vodou a z 5 % AcN MS kvality a MF B byla složena pouze z vody MS kvality. Gradient MF je vyobrazen na obrázku (Obr. 22) a popsán v tabulce (Tab. 3). Bylo možno pracovat s kolonou v oblasti pH mezi 1,5 a 7 a při maximálním přípustném tlaku 65 000 kPa. Retenční časy (RT) a hodnoty m/z STD a IS* BAs jsou uvedeny v tabulce (Tab. 4).

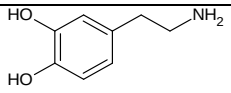
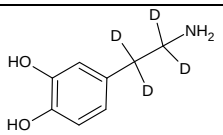
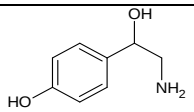
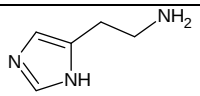
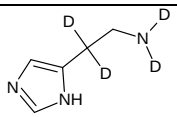


Obrázek 22: Gradient mobilních fází (MF) pro chromatografickou separaci při použití kolony ARION® Polar C18.

Tabulka 3: Popis gradientu mobilních fází (MF) při chromatografické separaci s použitím kolony ARION® Polar C18.

Čas (minuty)	**Průtok (ml.min^{-1})**	**%B**
0,000	Začátek analýzy	
1,000	0,300	1,0
3,500	0,300	1,0
4,000	0,300	80,0
5,000	0,300	80,0
5,500	0,300	1,0
9,000	Konec analýzy	

Tabulka 4: Přehled RT a hodnot m/z pro STD dopamin, oktopamin a histamin a IS dopamin-D_4 a histamin-D_4 (STD – standard; IS* – interní standard); obrázky strukturních vzorců vytvořeny v programu ChemSketch; hodnoty m/z byly získány z internetové platformy enviPat Web (Loos et al., 2015; URL webu: https://www.envipat.eawag.ch/index.php).*

STD/IS*	Strukturní vzorec	Hodnota m/z (MS a MS/MS iontů)	RT (min)
Dopamin		154,0863 → 137,0836	2,8 ± 0,09
Dopamin-D_4 (IS*)		158,1114 → 141,1086	2,8 ± 0,09
Oktopamin		154,0863 → 136,0757	1,8 ± 0,09
Histamin		112,0869 → 95,0607	1,4 ± 0,09
Histamin-D_4 (IS*)		116,1120 → 99,0858	1,4 ± 0,09

5.2.2 POSTUP ANALÝZY ZPRACOVÁNÍ BIOLOGICKÉHO VZORKU S DERIVATIZACÍ

V této kapitole byla oproti kapitole 5.2.1 změněna strategie celého postupu zpracování biologického materiálu – v části extrakce byla použita rozdílná extrakční činidla, po extrakci byla do pracovního postupu začleněna derivatizace vzorku pomocí BzCl a změněna byla i chromatografická separace včetně použití odlišné chromatografické kolony. Hmotnostně spektrometrická analýza probíhala obdobným způsobem.

5.2.2.1 Příprava kalibrační křivky

Po optimalizačním postupu byla připravena kalibrační křivka pro extrakci v 90% AcN s 0,1% FA ve vodě (výsledná procentuální koncentrace FA v extrakčním činidle byla 0,01 %) s následnou derivatizací. Tato kalibrační křivka o 16 bodech ovšem nedisponovala při následné kvantifikaci BAs v trávicím traktu, jedové žláze a jedu včel požadovaným rozpětím koncentrací, a proto byla přepracována v další kalibrační křivku, ve která sestávala z 24 bodů s upraveným rozmezím koncentrací STD.

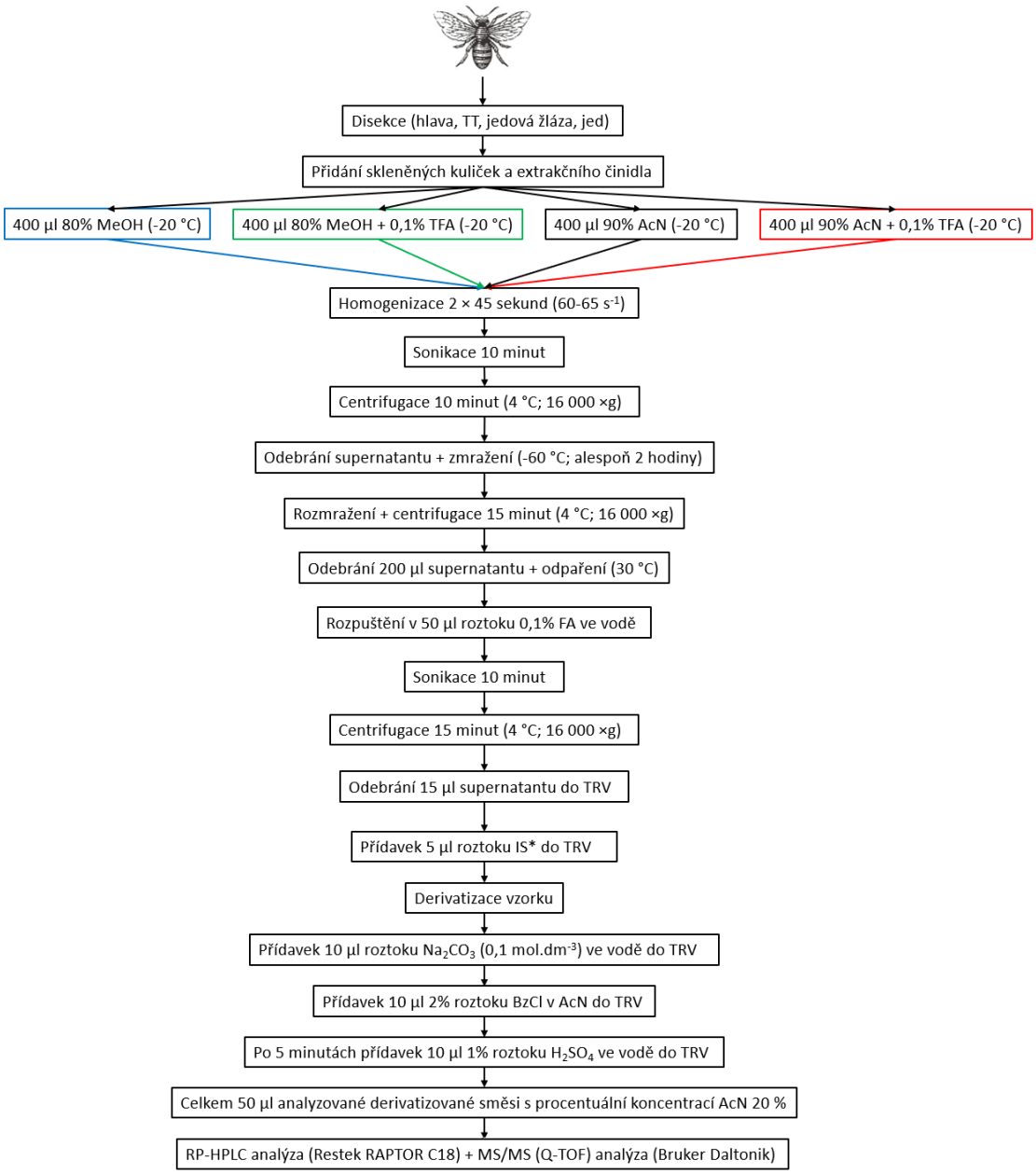
Kalibrační křivka tvořená 24 body obsahovala jednotnou koncentraci IS* (Bz-dopamin-D_4 a Bz-histamin-D_4 4 000 nmol.dm^{-3}) a vzrůstající koncentraci STD BAs ve vialkách (50, 100, 150, 200, 300, 500, 700, 1 000, 1 200, 1 500, 2 000, 2 500, 3 000, 4 000, 5 000, 7 000, 10 000, 12 000, 15 000, 20 000, 25 000, 30 000, 40 000 a

50 000 nmol.dm^{-3} pro Bz-dopamin a Bz-histamin, pro Bz-oktopamin byly koncentrace v každém kalibračním bodu desetinásobně nižší ve srovnání s koncentrací Bz-dopaminu a Bz-histaminu). Používané STD i IS* byly rozpuštěny v 0,1% FA a následně naředěny na koncentrace 1 µmol.dm^{-3} (v případě STD oktopaminu) a 10 µmol.dm^{-3} (v případě STD dopaminu a histaminu a IS* histaminu-D_4 a dopaminu-D_4). Vzniklé dva zásobní roztoky (STD a IS*) byly pipetovány do vialek. Po vnesení STD a IS* o požadovaných koncentracích do vialek byl celý obsah odpařen ve vakuové odparce při 45 °C a resuspendován ve 20 µl 0,1% FA. Byla provedena derivatizace vzorků kalibračních bodů přidáním nejprve 10 µl 0,1 mol.dm^{-3} Na_2CO_3 a poté vnesením 10 µl 2% BzCl v AcN. Derivatizační reakce byla ukončena po 10 minutách přídavkem 10 µl 1% H_2SO_4 v AcN, přičemž procentuální koncentrace AcN ve výsledné směsi odpovídala 30 %.

5.2.2.2 Postup extrakce v 80% MeOH, v 80% MeOH s 0,1% TFA, v 90% AcN a v 90% AcN s 0,1% TFA

Uvedený extrakční postup je shodný pro všechny čtyři kombinace extrakčních činidel pouze s drobnými změnami, které jsou zde popsány. Vybraná zmražená (-20 °C) část těla včely medonosné byla přenesena do 2 ml mikrozkumavky, bylo k ní přidáno několik skleněných kuliček a 400 µl příslušného vychlazeného (-20 °C) extrakčního činidla (80% MeOH; 80% MeOH s 0,1% TFA; 90% AcN; 90% AcN s 0,1% TFA). Vzniklé čtyři odlišné druhy vzorků byly vloženy do homogenizátoru, kde proběhla jejich homogenizace po dobu dvakrát 45 sekund při frekvenci homogenizátoru 60-65 s^{-1}. Vzorky byly následně sonikovány 10 minut a posléze centrifugovány při teplotě 4 °C a přetížení 16 000 ×g po dobu 10 minut. Všechny vzorky byly po centrifugaci přeneseny do čistých 1,5 ml mikrozkumavek. Pak byly zkoncentrovány vymražením na -60 °C (po dobu nejméně 2 hodin), opětovným rozmražením, centrifugací v časovém intervalu 15 minut při přetížení 16 000 ×g a snížené teplotě (4 °C) a odebráním 200 µl supernatantu, jenž byl následně odpařen při 30 °C (asi 30-60 minut). Rozpuštění všech druhů odparků bylo provedeno v 50 µl 0,1% FA. Rozpuštění vzorku probíhalo za současné sonikace po dobu 10 minut, která byla následována centrifugací při přetížení 16 000 ×g a 4 °C po dobu 15 minut. Do vialek bylo vneseno 15 µl supernatantu, dále bylo přidáno 5 µl připraveného zásobního roztoku IS* (roztok 10 µmol.dm^{-3} dopaminu-D_4 a 100 µmol.dm^{-3} histaminu-D_4 v 0,1% FA) s výsledným množstvím dopaminu-D_4 2,5 pmol a histaminu-D_4 250 pmol na nástřik. Pak byla provedena derivatizace vzorků, kdy bylo nejprve přidáno 10 µl 0,1 mol.dm^{-3} Na_2CO_3 za účelem úpravy hodnoty pH do

bazické oblasti a následně bylo do směsi napipetováno 10 µl 2% BzCl v AcN. Benzoylační reakce byla ukončena po 5 minutách změnou pH do kyselé oblasti přídavkem 10 µl 1% H_2SO_4. Objem 50 µl derivatizovaných vzorků s extrakcí v různých kombinacích extrakčních činidel, nicméně se stejnou procentuální koncentrací AcN ve výsledné směsi (20 %), byl připraven k HPLC-MS/MS analýze. Schematický pracovní postup pro zvolená extrakční činidla je zobrazen níže (Obr. 23).

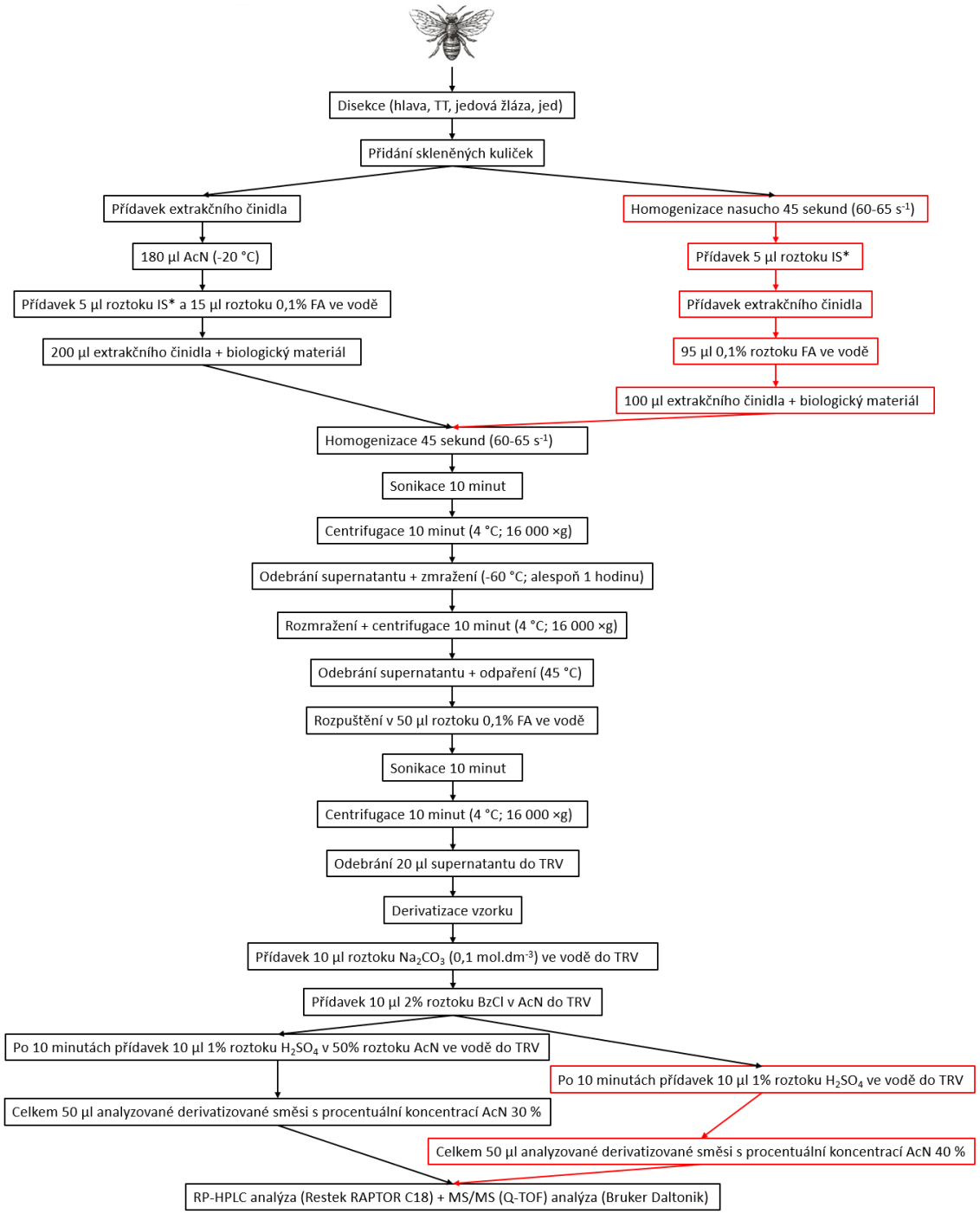


Obrázek 23: Schéma extrakčního postupu při extrakci v 80% MeOH, 80% MeOH s 0,1% TFA, 90% AcN a 90% AcN s 0,1% TFA (TT – trávicí trakt; FA – kyselina mravenčí; TRV – „total-recovery" vialky; IS* – interní standardy; BzCl – benzoylchlorid; RP-HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie v reverzní fázi; MS/MS – tandemová hmotnostní spektrometrie; Q-TOF – hybridní hmotnostní analyzátor složený z kvadrupólu a „time-of-flight" analyzátoru); obrázek včely převzat z: Shutterstock, Inc., 2023.

5.2.2.3 Postup extrakce v 0,1% FA a v 90% AcN s 0,01% FA

Extrakce v uvedených dvou extrakčních činidlech je opět analogický s drobnými úpravami a jejím prvním krokem bylo přenesení zmraženého biologického materiálu spolu se skleněnými kuličkami do 2 ml mikrozkumavky. Poté byl vzorek pro extrakci v 0,1% FA ve vodě vložen do homogenizátoru a homogenizován nasucho po dobu 45 sekund při frekvenci přístroje 60-65 s^{-1}. K tomuto homogenátu bylo přidáno 5 µl roztoku IS* (roztok 100 µmol.dm^{-3} dopaminu-D_4 a histaminu-D_4 v 0,1% FA) a 95 µl

0,1% FA na celkový objem extraktu 100 µl. 100 µl extrakčního činidla s IS* a biologickým materiálem bylo homogenizováno ještě jednou za stejného nastavení přístroje. Ke vzorku extrahovaném v 90% AcN s 0,01% FA bylo přidáno 180 µl koncentrovaného AcN, 5 µl roztoku IS* (roztok 100 µmol.dm^{-3} dopaminu-D_4 a histaminu-D_4 v 0,1% FA) a 15 µl 0,1% FA na doplnění extrakčního činidla do jeho finálního objemu 200 µl. Takto připravený vzorek byl homogenizován 45 sekund při frekvenci homogenizátoru 60-65 s^{-1}. Vzniklé extrakty s rozdílnými extrakčními činidly byly vyjmuty z přístroje, podrobeny sonikaci po dobu 10 minut a vloženy do centrifugy. Centrifugace probíhala 10 minut při snížené teplotě (4 °C) a přetížení 16 000 ×g. Supernatanty (asi 100 µl v případě extrakce v 0,1% FA a asi 200 µl v případě extrakce v 90% AcN s 0,01% FA) byly přeneseny do čistých 1,5 ml mikrozkumavek a vymraženy na -60 °C (po dobu alespoň 60 minut). Po vyjmutí z mrazáku byly vzorky rozpuštěny a centrifugovány při přetížení 16 000 ×g a teplotě 4 °C po dobu 10 minut. Došlo ke kvantitativnímu odebrání supernatantu do čistých 0,5 ml mikrozkumavek a jejich vložení do vakuové odparky, kde byly vzorky odpařeny při 45 °C (asi 30-60 minut). Následně byly odparky resuspendovány v 50 µl 0,1% FA za pomoci sonikace (10 minut) a takto rozpuštěné vzorky byly poté centrifugovány dalších 10 minut za nezměněného nastavení centrifugy. 20 µl supernatantu bylo napipetováno do vialek a byla provedena derivatizce vzorků. Pro úpravu pH bylo ke vzorku přidáno 10 µl 0,1 mol.dm^{-3} Na_2CO_3. Derivatizační reakce byla spuštěna přídavkem 10 µl 2% BzCl v AcN a po 10 minutách ukončena napipetováním 10 µl 1% H_2SO_4 ve vodě (v případě extrakce v FA), či 10 µl 1% H_2SO_4 v 50% AcN (v případě extrakce v 90% AcN s 0,01% FA). Výsledné objemy derivatizovaných vzorků (50 µl) se od sebe odlišovaly výslednou procentuální koncentrací AcN (40% koncentrace AcN v případě extrakce v FA a 30% koncentrace AcN v případě extrakce v 90% AcN s 0,01% FA). Takto byly derivatizované extrakty dvojího typu připraveny k vložení do přístroje a k HPLC-MS/MS analýze. Zde popsaná extrakce je shrnuta názorným schématem níže (Obr. 24).



Obrázek 24: Schéma extrakčního postupu při extrakci v 0,1% FA a AcN s 0,01% FA (TT – trávicí trakt; IS* – interní standardy; TRV – „total-recovery“ vialky; BzCl – benzoylchlorid; RP-HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie v reverzní fázi; MS/MS – tandemová hmotnostní spektrometrie; Q-TOF – hybridní hmotnostní analyzátor složený z kvadrupólu a „time-of-flight“ analyzátoru); obrázek včely převzat z: Shutterstock, Inc., 2023.

5.2.2.4 Chromatografická separace (Restek RAPTOR C18)

Pro chromatografickou separaci vzorků po derivatizaci bylo použito také systému HPLC v reverzní fázi. Byla použita kolona od společnosti Restek s názvem RAPTOR (2,7 µm, 100 mm × 2,1 mm) s nástřikem 5 µl a průtokem 0,4 ml.min^{-1}. MF A byla složena z

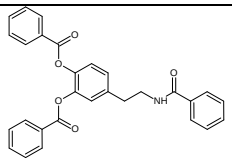
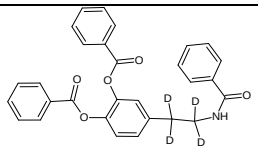
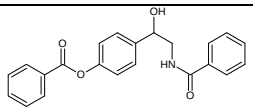
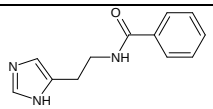
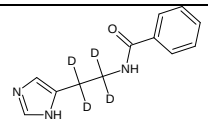
roztoku mravenčanu amonného (molární koncentrace 10 mmol.dm^{-3}) ve vodě, ke kterému byla přidána FA v množství odpovídajícím její výsledné procentuální koncentraci 0,1 %. Mobilní fázi B tvořil koncentrovaný AcN opět s 0,1% FA. Gradient MF je vyobrazen na obrázku (Obr. 25) a popsán v tabulce (Tab. 5). Kolona je vhodná pro práci v oblasti pH mezi 2 a 8 při maximálním přípustném tlaku 60 000 kPa. RT a hodnoty m/z derivatizovaných STD a IS* jsou uvedeny v tabulce (Tab. 6).

Obrázek 25: Gradient mobilních fází (MF) pro chromatografickou separaci při použití kolony Restek RAPTOR C18.

Tabulka 5: Popis gradientu mobilních fází (MF) při chromatografické separaci s použitím kolony Restek RAPTOR C18.

Čas (minuty)	**Průtok (ml.min^{-1})**	**%B**
0,000	Začátek analýzy	
1,200	0,400	2,0
3,000	0,400	35,0
3,500	0,400	60,0
5,000	0,400	70,0
6,500	0,400	100,0
7,500	0,400	100,0
7,800	0,400	2,0
9,000	Konec analýzy	

Tabulka 6: Přehled RT a hodnot m/z pro derivatizované STD Bz-dopamin, Bz-oktopamin a Bz-histamin a derivatizované IS Bz-dopamin-D_4 a Bz-histamin-D_4 (STD – standard; IS* – interní standard; BzCl – benzoylchlorid); obrázky strukturních vzorců vytvořeny v programu ChemSketch; hodnoty m/z byly získány z internetové platformy enviPat Web (Loos et al., 2015; URL webu: https://www.envipat.eawag.ch/index.php).*

STD/IS*	Strukturní vzorec	Hodnota m/z (MS)	Hodnota m/z (fragmentační iont – BzCl)	RT (min)
Bz-dopamin		483,1676	105,0335	6,0 ± 0,09
Bz-dopamin-D_4 (IS*)		487,1927	105,0335	6,0 ± 0,09
Bz-oktopamin		344,1281	105,0335	5,1 ± 0,09
Bz-histamin		216,1131	105,0335	3,1 ± 0,09
Bz-histamin-D_4 (IS*)		220,1382	105,0335	3,1 ± 0,09

5.2.3 HMOTNOSTNĚ SPEKTROMETRICKÁ ANALÝZA

BAs byly detekovány a kvantifikovány na přístroji Compact qTOF (Bruker Daltonik, Německo) s využitím ionizace elektrosprejem (ESI) – systém byl řízen programem OTOF Control (Bruker Daltonik, Německo), data byla zpracována v programu Data Analysis – verze 1.4 (Bruker Daltonik, Německo), látková množství BAs byla kvantifikována v programu TASQ – verze 1.4 (Bruker Daltonik, Německo). Analýza probíhala v pozitivním ionizačním skenovacím módu bbCID („broadband collision-induced dissociation“) při napětí kapiláry 4500 V, sušící teplotě 220 °C, tlaku sušícího plynu 300 000 Pa a jeho průtoku 9 $dm^{-3}.min^{-1}$. Hmotnostní spektra byla zaznamenána v rozmezí 60 až 1000 m/z s frekvencí 12 Hz. Pro kalibraci hmotnostního analyzátoru byl použit mravenčan sodný připravený dle návodu firmy Bruker Daltonik. Nastavení hmotnostního spektrometru bylo totožné pro derivatizované i nederivatizované vzorky.

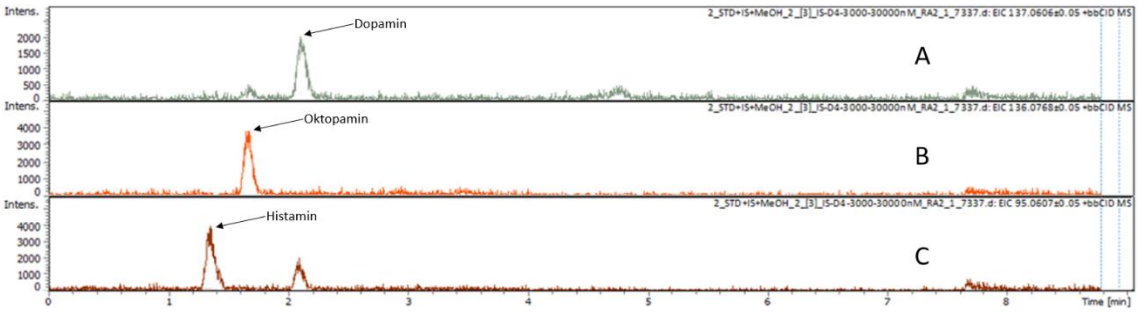
6 VÝSLEDKY

Výsledková část byla rozdělena do dvou hlavních kapitol v závislosti na tom, zda byly vzorky po extrakčním postupu následně derivatizovány, či nikoliv. V každé z kapitol je nejprve popsán optimalizační postup zpracování vzorků a následně jejich kvantifikace. Závěrem výsledkové části této práce je vyobrazen optimalizovaný protokol zpracování biologického materiálu, extrakce a kvantifikace vybraných BAs (dopamin, oktopamin a histamin) ze zvolených částí těla včely medonosné (*Apis mellifera*).

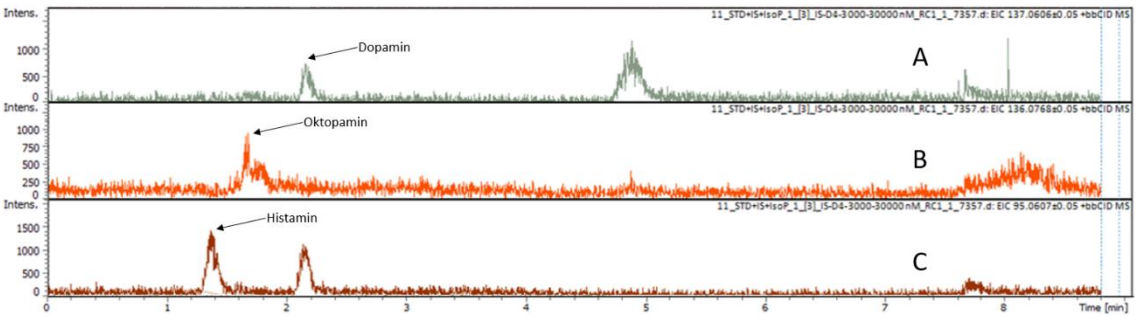
6.1 Optimalizace extrakce a LC-MS analýza nederivatizovaného biologického vzorku

6.1.1 Srovnání účinnosti extrakčních činidel – 80% MeOH, nebo 80% IsoP s 0,1% TFA, 0,2 mol.dm^{-3} $HClO_4$

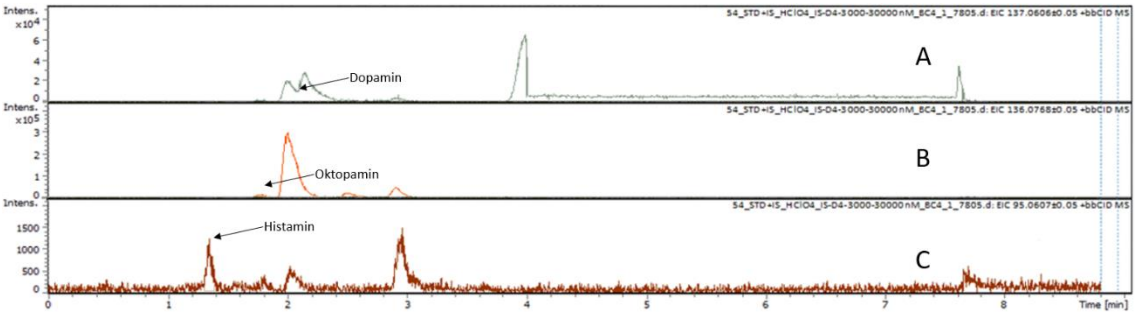
Nejprve byla porovnána účinnost extrakčních činidel 80% MeOH s 0,1% TFA, 80% IsoP s 0,1% TFA a 0,2 mol.dm^{-3} $HClO_4$ při stanovení STD dopaminu, oktopaminu a histaminu (dopamin a oktopamin 0,2 nmol a histamin 2 nmol v nástřiku) za současného přidání IS* (dopamin-D_4 0,15 nmol a histamin-D_4 1,5 nmol v nástřiku). Tvary chromatografických píků jsou vyobrazeny na chromatogramech (Obr. 26; 27; 28) a jejich průměrné plochy s odchylkami zaneseny v grafech (Obr. 29; 30; 31).



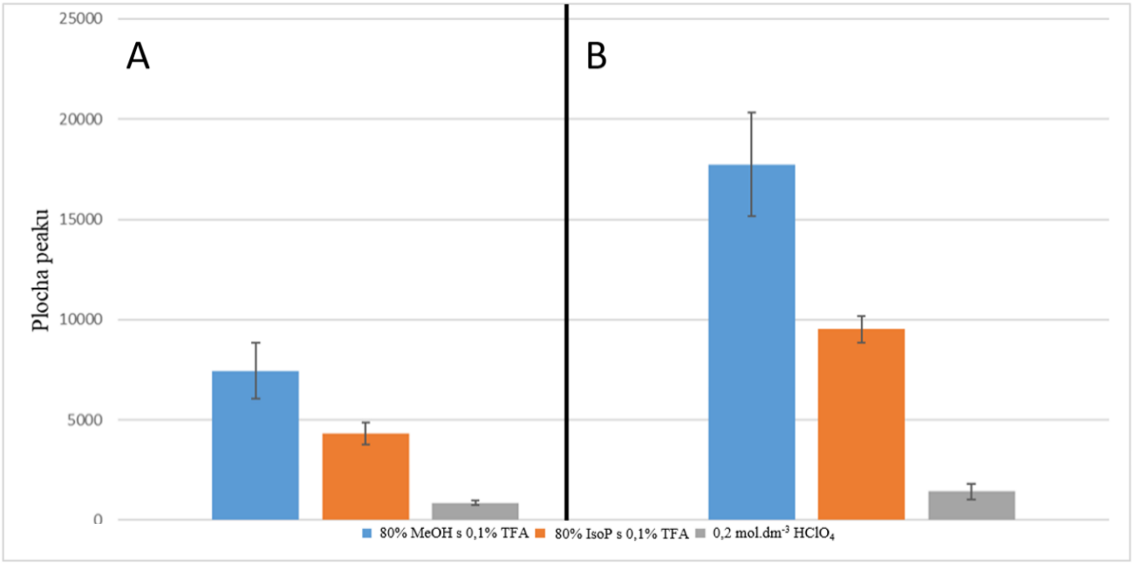
Obrázek 26: Chromatogram stanovení STD BAs – dopamin (chromatogram A), oktopamin (chromatogram B), histamin (chromatogram C) po extrakci v 80% MeOH s 0,1% TFA.



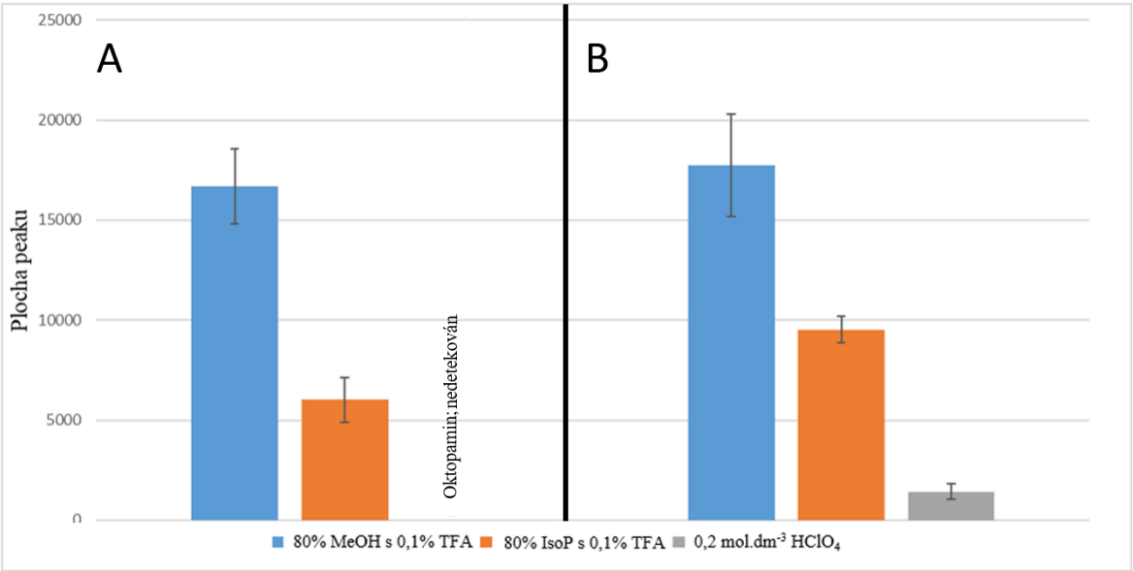
Obrázek 27: Chromatogram stanovení STD BAs – dopamin (chromatogram A), oktopamin (chromatogram B), histamin (chromatogram C) po extrakci v 80% IsoP s 0,1% TFA.



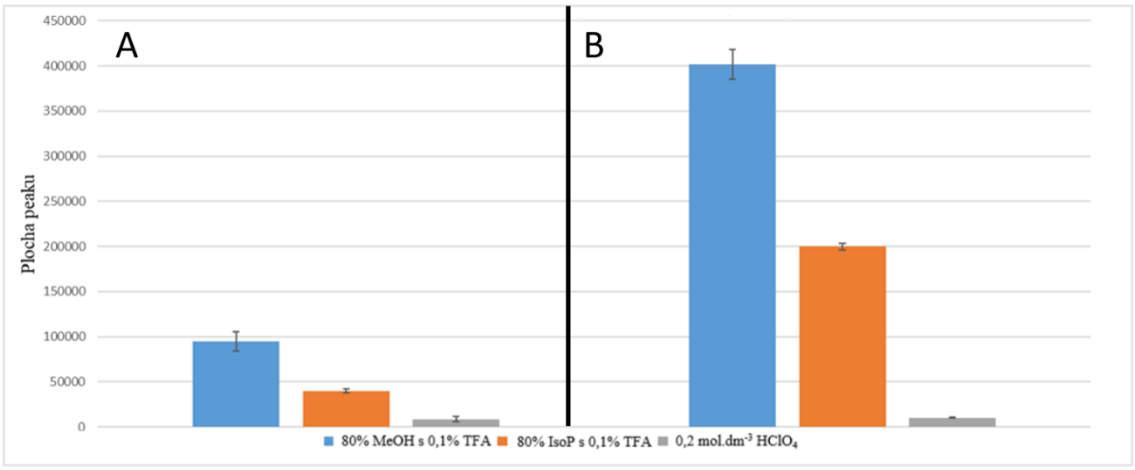
Obrázek 28: Chromatogram stanovení STD BAs – dopamin (chromatogram A), oktopamin (chromatogram B), histamin (chromatogram C) po extrakci v 0,2 mol.dm^{-3} $HClO_4$.



Obrázek 29: Srovnání průměrů ploch chromatografických píků STD dopaminu (část A) a IS* dopaminu-D_4 (část B) po extrakci v 80% MeOH s 0,1% TFA, 80% IsoP s 0,1% TFA a 0,2 mol.dm^{-3} $HClO_4$ s vyznačenými směrodatnými odchylkami (*SD*) měření.



Obrázek 30: Srovnání průměrů ploch chromatografických píků STD oktopaminu (část A) a IS* dopaminu-D_4 (část B) po extrakci v 80% MeOH s 0,1% TFA, 80% IsoP s 0,1% TFA a 0,2 mol.dm^{-3} $HClO_4$ s vyznačenými SD měření.



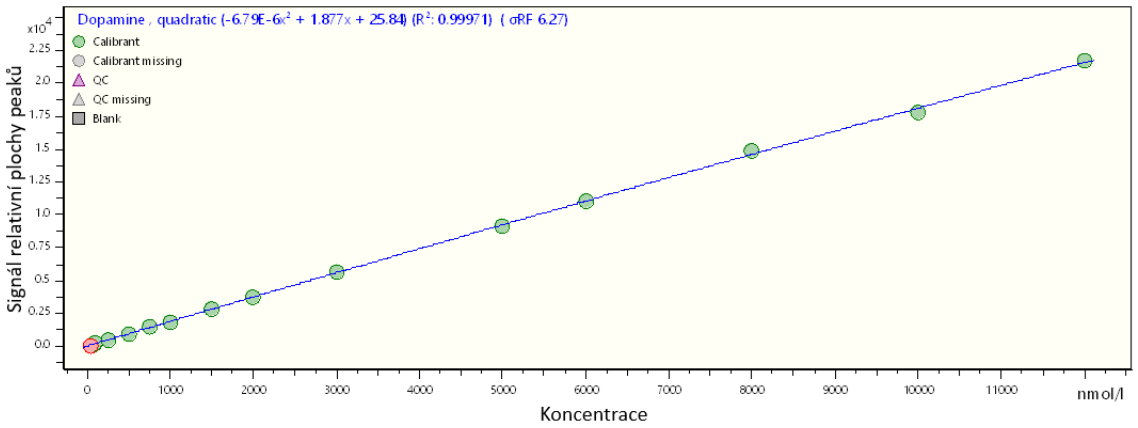
Obrázek 31: Srovnání průměrů ploch chromatografických píků STD histaminu (část A) a IS* histaminu-D_4 (část B) po extrakci v 80% MeOH s 0,1% TFA, 80% IsoP s 0,1% TFA a 0,2 mol.dm^{-3} $HClO_4$ s vyznačenými (*SD*) měření.

Z ploch (Obr. 29; 30; 31) a tvarů (Obr. 26; 27; 28) chromatografických píků je zřejmé, že extrakce STD všech BAs a IS* dopaminu-D_4 a histaminu-D_4 probíhala nejlépe v extrakčním činidle složeném z 80% MeOH s 0,1% TFA. Plochy píků všech STD i IS* jsou v téměř všech případech dvojnásobné v porovnání s plochami píků vzorků extrahovaných v 80% IsoP s 0,1% TFA. IsoP jevil nižší extrakční účinnost než MeOH a navíc docházelo při jeho použití také k prodloužení pracovního postupu, jelikož má vyšší teplotu varu než MeOH, tím pádem byl znatelně prodloužen čas odpařování vzorku. Nejnižší extrakční účinnost vykazovala 0,2 mol.dm^{-3} $HClO_4$ – až desetinásobně nižší než 80% MeOH s 0,1% TFA. Toto značné snížení signálu píků bylo pravděpodobně způsobeno iontovou supresí vzorku, kterou způsobovala $HClO_4$ jakožto silná kyselina. Do experimentu byl také začleněn pokus o oddělení $HClO_4$ od samotného vzorku po extrakci a následného rozpuštění vzorku v FA (jako v případě extrakce v MeOH a IsoP). Bylo použito C18 SPE disků, pomocí kterých bylo ovšem oddělení analytů od extrakčního činidla neúspěšné. Jako nejvhodnější extrakční činidlo pro extrakci zvolených BAs z biologického materiálu byl tedy vybrán 80% MeOH s 0,1% TFA.

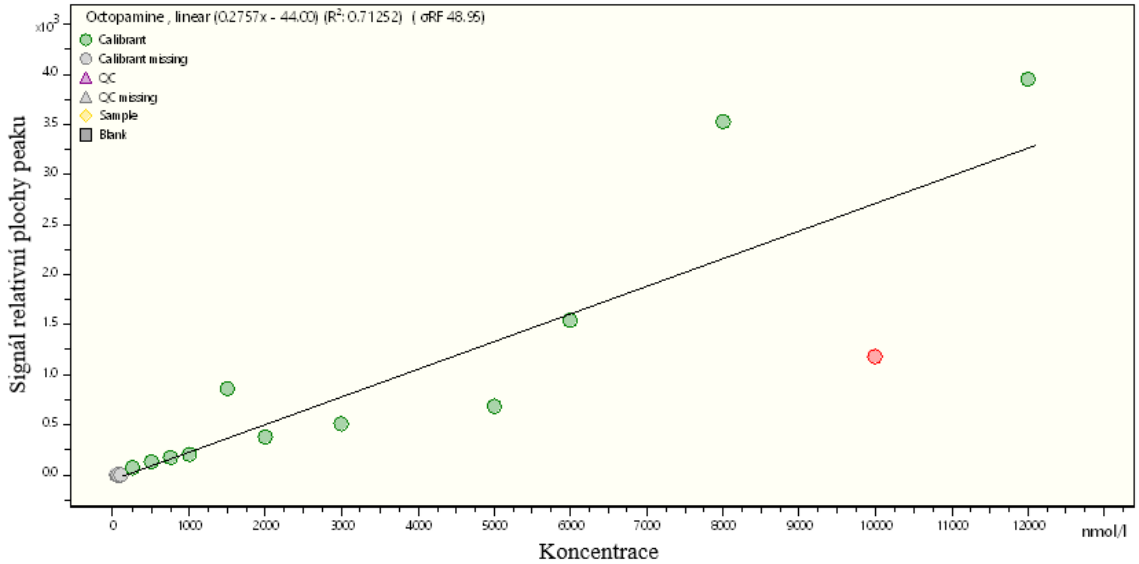
6.2 Měření a kvantifikace nederivatizovaných vzorků

6.2.1 KALIBRAČNÍ KŘIVKY

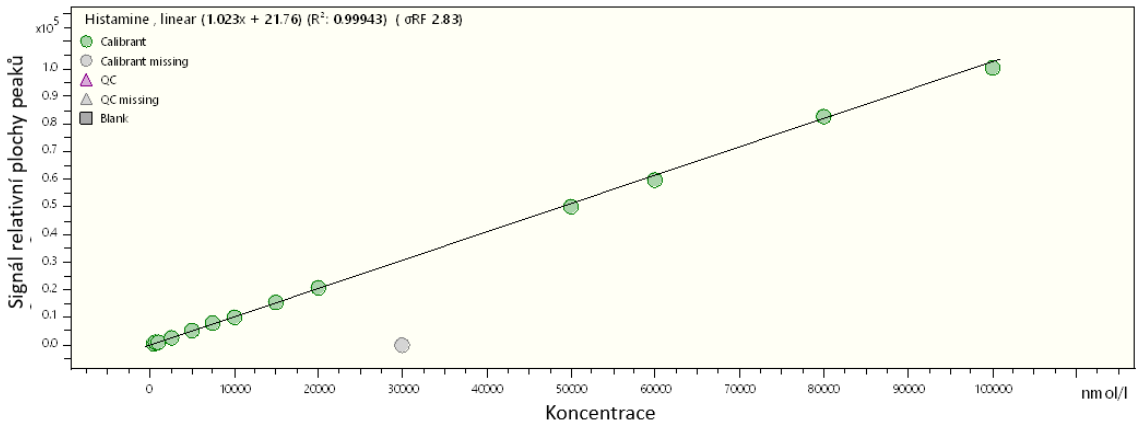
Pro dopamin, oktopamin a histamin byly vypracovány kalibrační křivky pro extrakci v MeOH. Pro oktopamin se kalibrační křivku vhodnou pro jeho kvantifikaci nepodařilo připravit, pro dopamin a histamin vznikly kalibrační křivky složené ze 16 bodů, z nichž byla použita křivka histaminu pro jeho kvantifikaci ve vzorcích tkání včel. Kalibrační křivky pro kvantifikaci dopaminu, oktopaminu a histaminu jsou zobrazeny níže (Obr. 32; 33; 34).



Obrázek 32: Kalibrační křivka dopaminu pro extrakci v 80% MeOH s 0,1% TFA.



Obrázek 33: Kalibrační křivka oktopaminu pro extrakci v 80% MeOH s 0,1% TFA – nelze použít pro kvantifikaci.

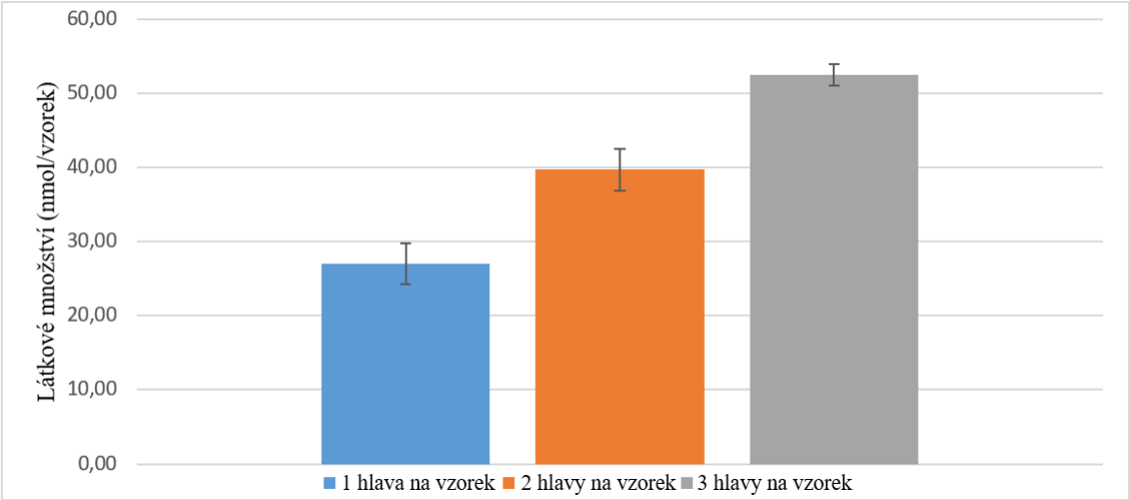


Obrázek 34: Kalibrační křivka histaminu pro extrakci v 80% MeOH s 0,1% TFA.

Ze vzniklé kalibrační křivky dopaminu (Obr. 32) a její kvadratické regrese $y = -6{,}79^{-6}x^2 + 1{,}877x + 25{,}84$ ($R^2 = 0{,}9997$) bylo možné kvantifikovat dopamin v biologických vzorcích. Kalibrační křivku oktopaminu nebylo možné pro kvantifikaci použít z důvodu nepřesného naměření jeho kalibračních bodů (Obr. 33). Při tvorbě kalibrační křivky oktopaminu bylo totiž zjištěno, že vykazuje nízkou stabilitu, či pro něj není správně nastavena chromatografická separace, tudíž nebylo ani možno použít kalibrační křivku pro jeho kvantifikaci. Pomocí vzniklé kalibrační křivky histaminu (Obr. 34) byl tento amin prostřednictvím lineární regrese $y = 1{,}023x + 21{,}76$ ($R^2 = 0{,}9994$) kvantifikován ve vzorcích skládajících se z různého počtu včelích hlav.

6.2.2 KVANTIFIKACE VZORKŮ

Při kvantifikaci histaminu bylo použito včel dodaných vedoucím práce. Pomocí kalibrační křivky (Obr. 34) bylo vypočítáno látkové množství histaminu ve vzorku, který byl připraven extrakcí jedné, dvou, nebo tří hlav včely medonosné v 80% MeOH s 0,1% TFA (měřeno vždy v triplikátu). Látková množství histaminu v těchto vzorcích jsou uvedena včetně odchylek v grafu (Obr. 35).



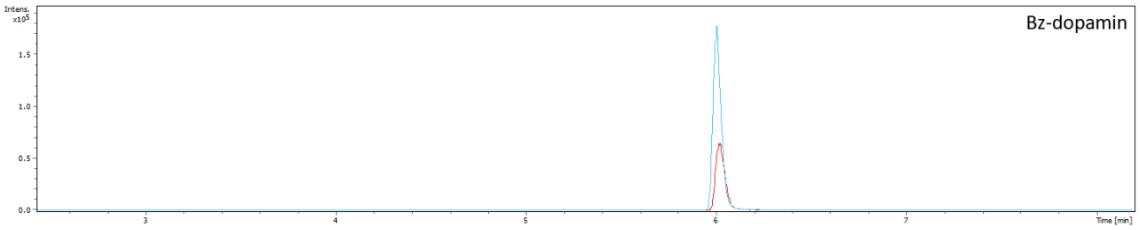
Obrázek 35: Průměry naměřených látkových množství histaminu ve vzrůstajícím počtu včelích hlav (měřeno vždy v triplikátu vzorků).

Histamin byl úspěšně kvantifikován ve vzrůstajícím počtu včelích hlav, přičemž jeho látkové množství s rostoucím počtem hlav také podle správného předpokladu narůstalo (Obr. 35). Po extrakci vzorků v 80% MeOH s 0,1% TFA nebylo ovšem z důvodu silného vlivu matricových efektů možno detekovat dopamin a oktopamin (i po přídavku jejich STD se látkové množství BAs dopaminu a oktopaminu pohybovalo v nedetekovatelné hladině). Proto byl uvedený experiment zaměřen pouze na kvantifikaci histaminu, který se ve vzorcích nacházel ve vysoké množství. Mimoto vyvstal problém se stabilitou, či schopností separace oktopaminu, pro jehož kvantifikaci nebylo možné sestavit ani spolehlivou kalibrační křivku. Za účelem kvantifikace všech tří stanovovaných BAs by bylo třeba metodu optimalizovat například vhodným prepurifikačním krokem (například iontoměničová chromatografie), který by byl ovšem metodicky i ekonomicky náročný. Jako vhodná a metodicky méně náročná alternativa byla zvolena derivatizace vzorku s použitím BzCl.

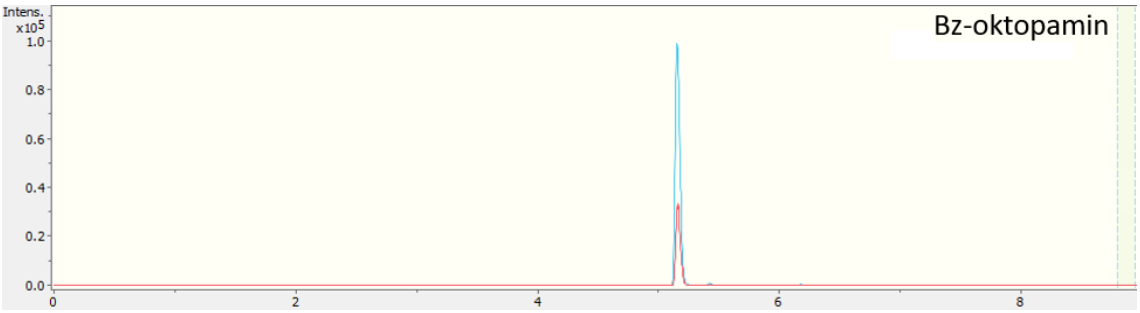
6.3 Optimalizace extrakce a LC-MS analýza derivatizovaného biologického vzorku

6.3.1 VOLBA VHODNÉ MOBILNÍ FÁZE CHROMATOGRAFICKÉ SEPARACE

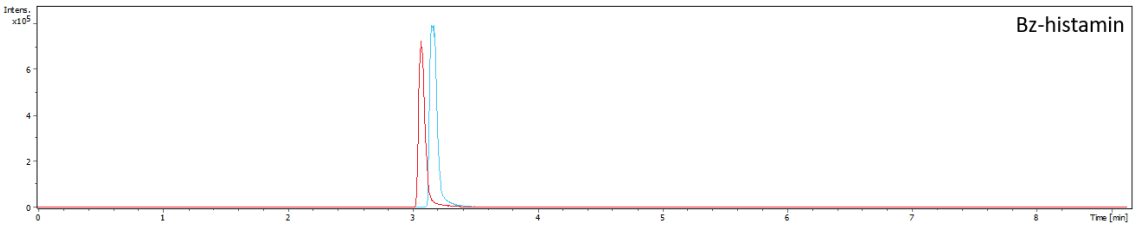
Nejprve proběhlo porovnání separační chromatografické kolony Restek RAPTOR C18 za použití rozdílného složení MF. Porovnávány byly kombinace MF složeny z MF A (0,5% FA ve vodě) a MF B (0,5% FA v AcN) zastupující dříve použitou kombinaci MF, a z MF A (0,01 mol.dm^{-3} mravenčan amonný v 0,1% FA ve vodě) a MF B (0,1% FA v AcN) (Obr. 36; 37; 38). Měření probíhalo pouze se STD BAs (Bz-dopamin a Bz-oktopamin 50 pmol v nástřiku; Bz-histamin 500 pmol v nástřiku) za přidání IS* (Bz-dopamin-D_4 a Bz-histamin-D_4 500 pmol v nástřiku) po extrakčním postupu zahrnující 80% MeOH s 0,1% TFA.



Obrázek 36: Chromatogram STD Bz-dopaminu extrahovaného ze vzorku v 80% MeOH s 0,1% TFA porovnávající intenzitu jeho píku při separaci za použití dvou různých mobilních fází (MF): 1. MF A (0,5% FA ve vodě) + MF B (0,5% FA v AcN) – značeno červenou barvou; 2. MF A (0,01 mol.dm^{-3} mravenčan amonný v 0,1% FA ve vodě) + MF B (0,1% FA v AcN) – značeno světle modrou barvou.



Obrázek 37: Chromatogram STD Bz-oktopaminu extrahovaného ze vzorku v 80% MeOH s 0,1% TFA porovnávající intenzitu jeho píku při separaci za použití dvou různých mobilních fází (MF): 1. MF A (0,5% FA ve vodě) + MF B (0,5% FA v AcN) – značeno červenou barvou; 2. MF A (0,01 mol.dm^{-3} mravenčan amonný v 0,1% FA ve vodě) + MF B (0,1% FA v AcN) – značeno světle modrou barvou.



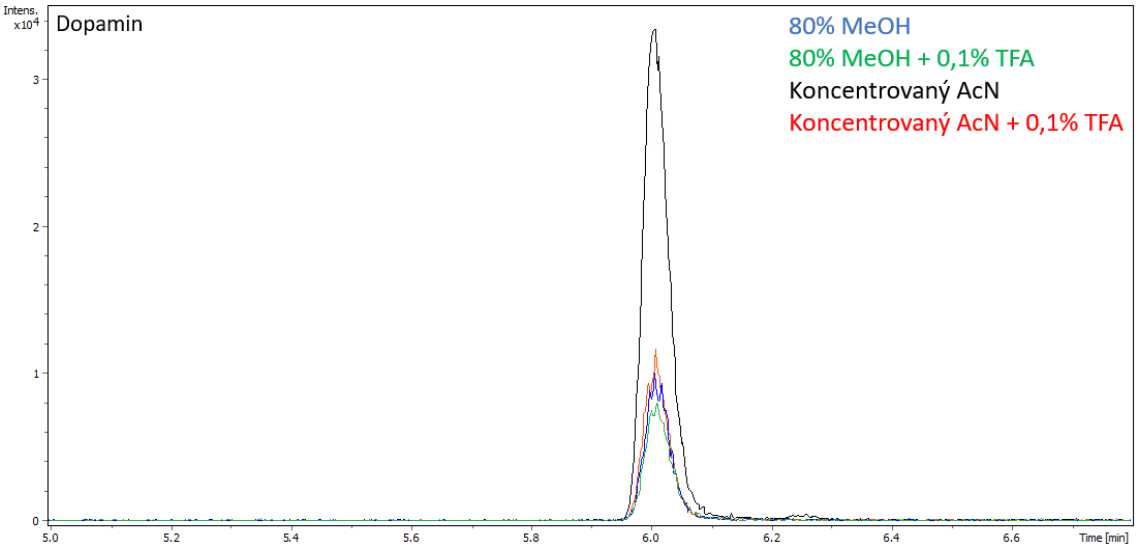
Obrázek 38: Chromatogram STD Bz-histaminu extrahovaného ze vzorku v 80% MeOH s 0,1% TFA porovnávající intenzitu jeho píku při separaci za použití dvou různých mobilních fází (MF): 1. MF A (0,5% FA ve vodě) + MF B (0,5% FA v AcN) – značeno červenou barvou; 2. MF A (0,01 mol.dm^{-3} mravenčan amonný v 0,1% FA ve vodě) + MF B (0,1% FA v AcN) – značeno světle modrou barvou.

Před samotnou optimalizací extrakce s následnou derivatizací (pomocí BzCl) a LC-MS analýzou vzorků včel nutné upravit metodu chromatografické separace včetně výměny chromatografické kolony (viz kapitola 5.2.2.4). Zjištěny byly také hodnoty m/z a RT pro derivatizované STD a IS* Bz-dopamin, Bz-oktopamin, Bz-histamin, Bz-dopamin-D_4 a Bz-histamin-D_4 (Tab. 6). S použitím pracovního postupu využívajícího extrakci v 80% MeOH s 0,1% TFA (Obr. 23) byly zpracovány STD dopaminu, oktopaminu a histaminu.

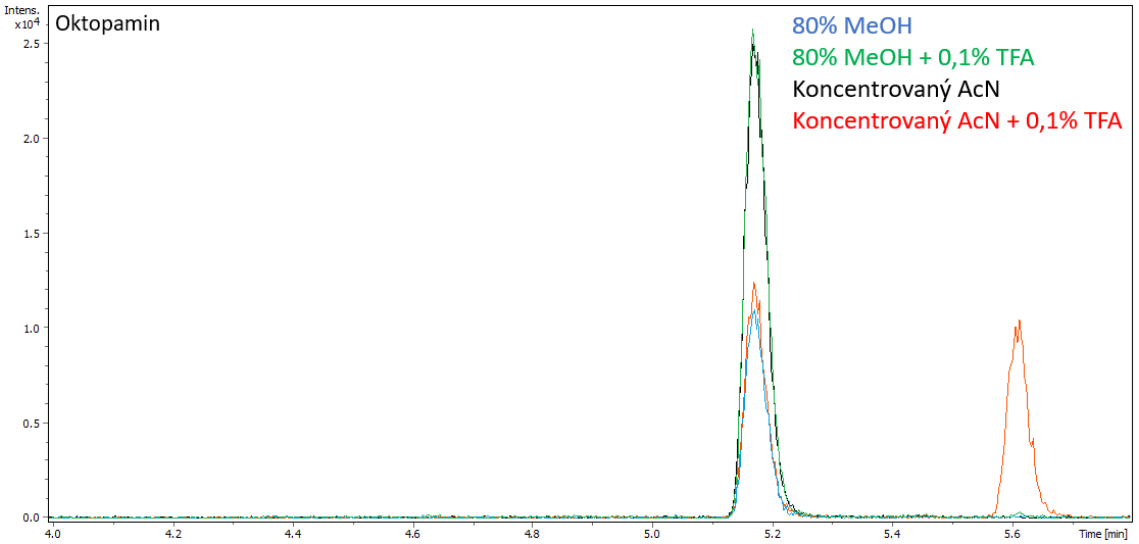
Z proložených chromatogramů obou MF pro jednotlivé STD vybraných BAs (Obr. 36; 37; 38) je zřejmé, že při použití nově zvolené kombinace MF (značeno světle modrou barvou) docházelo v porovnání s původní kombinací MF (značeno červenou barvou) k výraznému zvýšení intenzit signálů u STD Bz-dopaminu a Bz-oktopaminu. V případě STD Bz-histaminu došlo k menšímu navýšení intenzity jeho signálu a současně byl i drobně posunut jeho RT (z 3,1 minut na 3,2 minut). Obdobné výsledky byly dosaženy i po extrakci BAs ze vzorku včel za stejných extrakčních podmínek.

6.3.2 POROVNÁNÍ RŮZNÝCH EXTRAKČNÍCH ČINIDEL

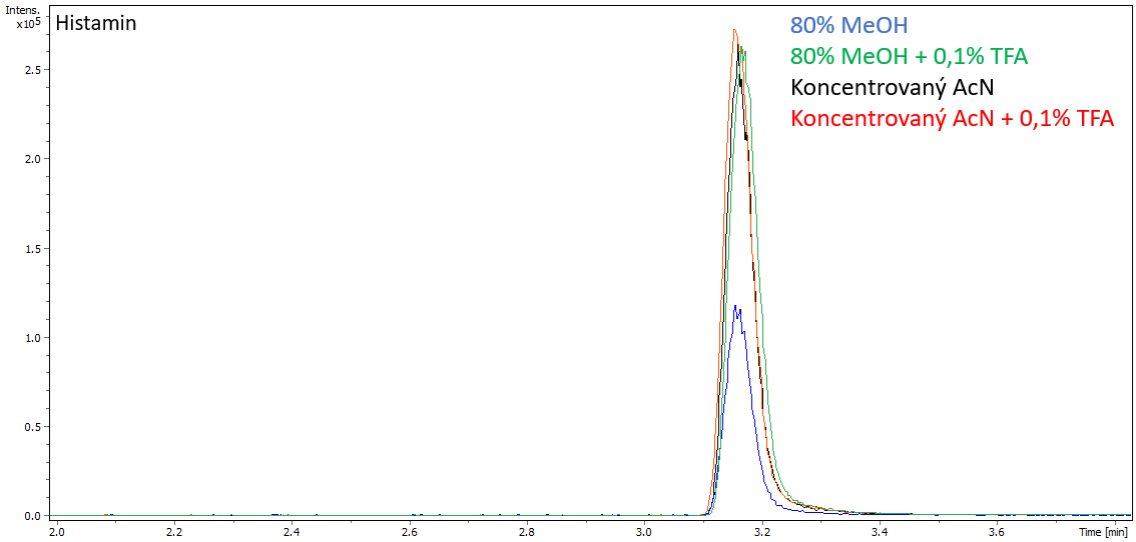
V další fázi optimalizačního postupu extrakce a zpracování vzorku s následným provedením derivatizace byla srovnána různá extrakční činidla (80% MeOH, 80% MeOH s 0,1% TFA, 90% AcN, 90% AcN s 0,1% TFA). Měření probíhalo po extrakci jedné včelí hlavy na vzorek, do kterého byl přidán navíc zásobní roztok STD a IS* (dopamin, oktopamin, histamin, dopamin-D_4 a histamin-D_4 50 pmol v nástřiku). Porovnání vhodnosti jednotlivých činidel je pro všechny tři BAs možno pozorovat na překrytých chromatogramech (Obr. 39; 40; 41).



Obrázek 39: Překryté chromatogramy analytu Bz-dopaminu porovnávající intenzitu jeho píku, a tedy i vhodnost čtyř různých extrakčních činidel (80% MeOH, 80% MeOH s 0,1% TFA, 90% AcN, 90% AcN s 0,1% TFA při extrakci jedné včelí hlavy na vzorek).



Obrázek 40: Překryté chromatogramy analytu Bz-oktopaminu porovnávající intenzitu jeho píku, a tedy i vhodnost čtyř různých extrakčních činidel (80% MeOH, 80% MeOH s 0,1% TFA, 90% AcN, 90% AcN s 0,1% TFA při extrakci jedné včelí hlavy na vzorek). Chromatografický pík v RT 5,6 minut (značen červenou barvou) indikuje přítomnost další neidentifikovatelné molekuly ve vzorku včelí hlavy.



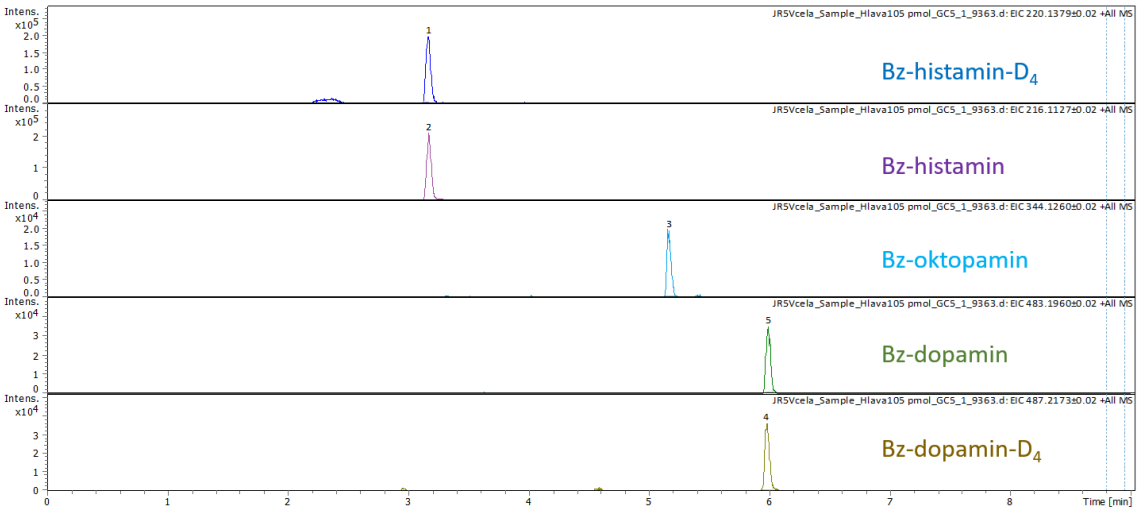
Obrázek 41: Překryté chromatogramy analytu Bz-histaminu porovnávající intenzitu jeho píku, a tedy i vhodnost čtyř různých extrakčních činidel (80% MeOH, 80% MeOH s 0,1% TFA, 90% AcN, 90% AcN s 0,1% TFA při extrakci jedné včelí hlavy na vzorek).

Z chromatogramů vzorků (Obr. 39; 40; 41) zpracovaných dle příslušného pracovního postupu (Obr. 23) bylo zjištěno, že z vybraných extrakčních činidel (80% MeOH, 80% MeOH s 0,1% TFA, 90% AcN, 90% AcN s 0,1% TFA) je nejvíce vhodným činidlem 90% AcN (značen černou barvou), přičemž v případě Bz-oktopaminu (Obr. 40) a Bz-histaminu (Obr. 41) bylo určeno jako vhodné extrakční činidlo i 80% MeOH s 0,1% TFA (značen zelenou barvou). Nicméně pík Bz-dopaminu (Obr. 39) měl po extrakci v koncentrovaném AcN několikanásobně větší intenzitu než u všech ostatních extrakčních činidel. Naopak jako nejméně vhodné extrakční činidlo byl určen 80% MeOH.

6.3.3 Optimalizace extrakce

V experimentu muselo být z důvodu zachování stability dopaminu, které je spojeno s jeho snadným podléháním autooxidaci, zvolené extrakční činidlo složené z 90% AcN upraveno přídavkem malého množství FA (její celková procentuální koncentrace ve vzorku byla 0,01 %) – dopamin totiž při hodnotě ztrácí stabilitu a autooxiduje při hodnotě pH vyšší než 7 (Umek *et al.*, 2018). Volba přídavku FA byla podpořena skutečností, že se běžně používá v kombinaci s hmotnostně spektrometrickou detekcí a také je v této kyselině vzorek po derivatizaci následně rozpuštěn. Do 180 µl koncentrovaného AcN bylo tedy přidáno 10 µl zásobního roztoku IS* v 0,1% FA (250 µmol.dm^{-3}) a 10 µl zásobního roztoku STD v 0,1% FA (250 µmol.dm^{-3}). Výsledné látkové množství STD i IS* v nástřiku zůstalo v porovnání s předchozím experimentem zachováno (Bz-dopamin, Bz-oktopamin, Bz-histamin, Bz-dopamin-D_4 a Bz-histamin-D_4 50 pmol v nástřiku).

Tímto přídavkem STD a IS* v FA byla snížena procentuální koncentrace AcN v extrakčním činidle na 90 %. Byla určena vhodnost extrakčního činidla při extrakci jedné včelí hlavy na vzorek v 90% AcN s 0,01% FA (Obr. 42).



Obrázek 42: Chromatogramy analytů BAs – Bz-dopamin, Bz-oktopamin, Bz-histamin, Bz-dopamin-D_4, Bz-histamin-D_4 – při extrakci jedné včelí hlavy na vzorek v 90% AcN s 0,01% FA.

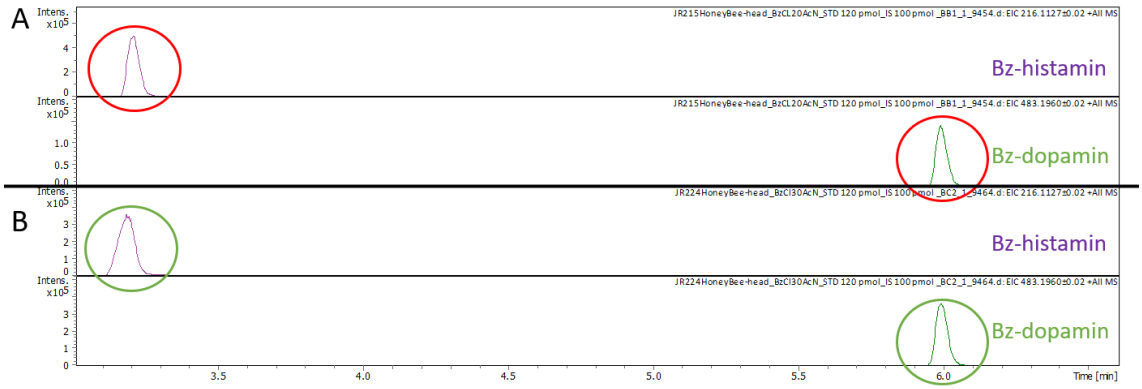
V porovnání s extrakcí v koncentrovaném AcN (Obr. 39; 40; 41 – vždy značeno černou barvou) vykazují píky BAs nově navrhnutého postupu extrakce (Obr. 42) za stejného přídavku látkového množství STD a IS* srovnatelné hodnoty intenzit. Po provedené extrakci vzorku byla jeho derivatizace ukončena stejným způsobem jako v předešlých dílčích experimentech (1% H_2SO_4 ve vodě), tudíž byla výsledná koncentrace AcN v měřené směsi 20 %. Takto vznikl drobně obměněný postup zpracování biologického materiálu pro detekci dopaminu, oktopaminu a histaminu v různých částech těla *Apis mellifera* (Obr. 24). Součástí tohoto experimentu byl i neúspěšný pokus o zpracování různých částí těla včely medonosné s extrakcí čistě v 0,1% FA, který je také zanesen v uvedeném schématu (Obr. 24).

6.3.4 Optimalizace koncentrace AcN v derivatizovaném vzorku

Derivatizovaná směs vzorku připraveného k LC-MS analýze (50 µl) obsahuje určitou objemovou procentuální koncentraci AcN, která se odvíjí od použití zásobních roztoků připravovaných k derivatizaci. Objem 50 µl vzorku po derivatizaci je tvořen 20 µl vzorku (rozpuštěného v 0,1% FA), 10 µl 0,1 mol.dm^{-3} Na_2CO_3, 10 µl 2% BzCl v AcN a 10 µl 1% H_2SO_4 ve vodě. Takto měřený vzorek obsahuje celkovou objemovou koncentraci AcN 20 %. Při rozpuštění vzorku v koncentrovaném AcN namísto v 0,1% FA a připravení 1% H_2SO_4 v AcN namísto vody může být celková objemová koncentrace AcN

v měřené směsi vzorku zvýšena až na 80 %. Koncentrace AcN odpovídající 40 % v analyzovaném vzorku měla ovšem negativní dopad na chromatografické chování analytů, protože píky dříve se eluujících analytů výrazně chvostovaly.

Cílem tohoto dílčího experimentu bylo stanovit optimální objemovou procentuální koncentraci AcN v měřené směsi a porovnat ji s původně zvolenou 20% koncentrací AcN. Byla tedy porovnána výsledná 20% a 30% koncentrace AcN v měřeném vzorku. Vzorek tvořila jedna celá včelí hlava, ke které byly přidány zásobní roztoky IS* (500 µmol.dm^{-3}) a STD (200 µmol.dm^{-3}) s výsledným množstvím IS* 100 pmol v nástřiku a výsledným množstvím STD vzrůstajícím od 0 pmol do 120 pmol v nástřiku. Extrakce biologického vzorku probíhala v 90% AcN s 0,01% FA. Derivatizace 20 µl vzorku (rozpuštěného v 0,1% FA) probíhala přídavkem nejprve 10 µl 0,1 mol.dm^{-3} Na_2CO_3 ve vodě a poté 10 µl 2% BzCl v AcN. Reakce byla ukončena buď 10 µl 1% H_2SO_4 ve vodě (výsledná 20% objemová koncentrace AcN), nebo 10 µl 1% H_2SO_4 v 50% AcN (výsledná 30% objemová koncentrace AcN). Změna tvaru chromatografických píků BAs je vyobrazena na chromatogramu (Obr. 43).



Obrázek 43: Přiblížený chromatogram zobrazující vliv celkové procentuální koncentrace AcN v měřené směsi po benzoylaci na změnu tvaru a plochy chromatografických píků Bz-dopaminu a Bz-histaminu; 20% koncentrace AcN – část A (označeno červenými kruhy); 30% koncentrace AcN – část B (označeno zelenými kruhy).

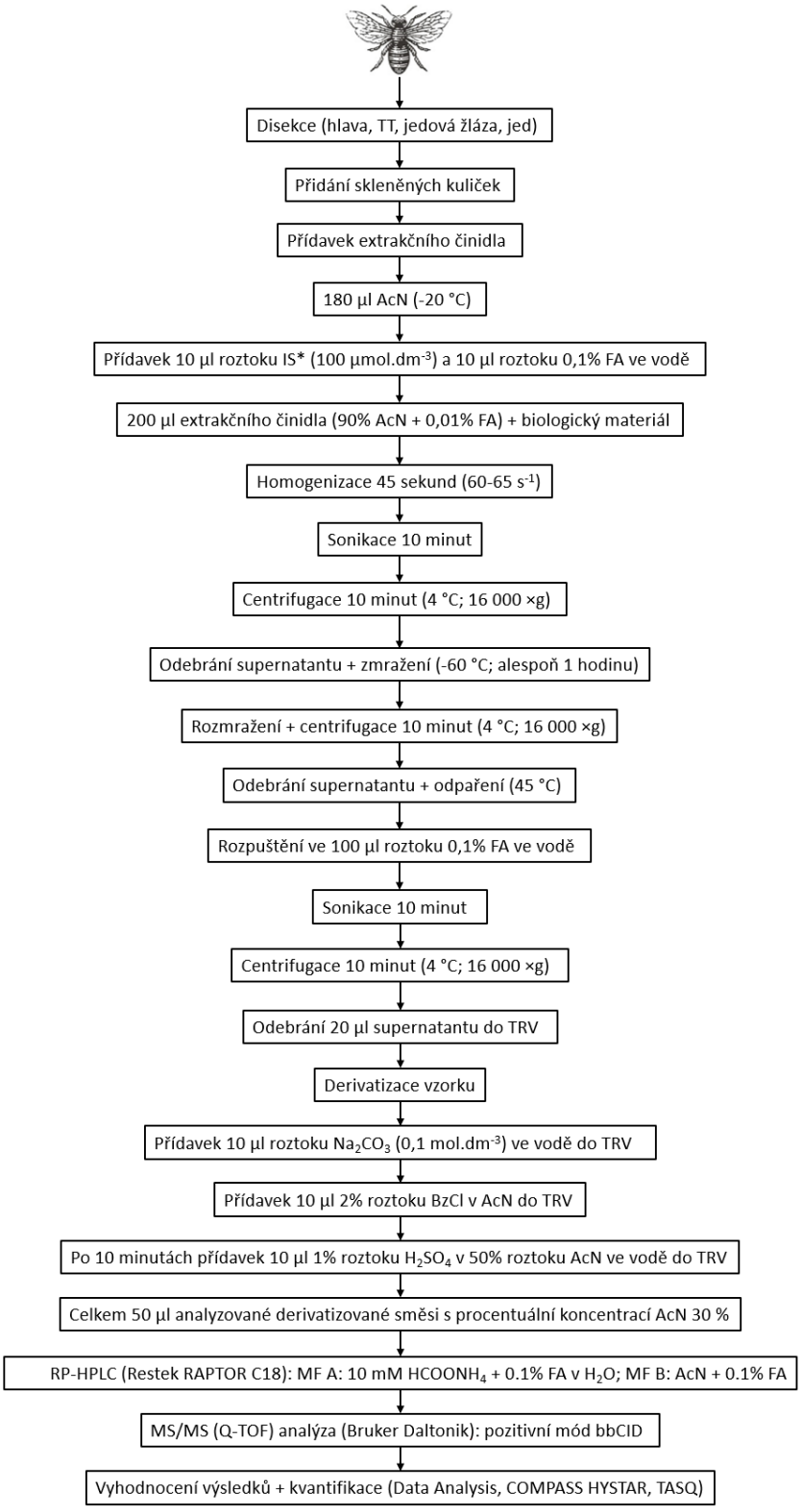
V experimentu bylo zjištěno, že na stabilitu vzorku a tvar chromatografického píku Bz-histaminu a Bz-histaminu-D_4 má vliv nízká, či příliš vysoká koncentrace AcN v analyzované směsi vzorku. Výsledná koncentrace AcN v měřené směsi vzorků byla také upravována přídavkem vody, či AcN po proběhnuté derivatizaci na hodnoty procentuální koncentrace AcN nižší než 20 %, respektive vyšší než 40 % – stabilita vzorku byla ovšem v obou případech snížena. Vyšší koncentrace AcN měla nicméně pozitivní vliv na zvýšení intenzity chromatografického píku Bz-dopaminu i Bz-dopaminu-D_4, tudíž byl hledán kompromis nacházející se v intervalu procentuálních

koncentrací AcN mezi 20 % a 40 %. Právě z toho důvodu byla porovnána intenzita píků vzorků s výslednou 20% a 30% koncentrací AcN v analyzované směsi. Při porovnání intenzity píků Bz-dopaminu a Bz-histaminu ve vzorku s výslednou 20% a 30% objemovou koncentrací AcN došlo u většiny vzorků se vzrůstající koncentrací AcN k mírnému snížení intenzity a chvostování píku Bz-histaminu a Bz-histaminu-D_4, nicméně zároveň došlo až k trojnásobnému nárůstu plochy a intenzity píku Bz-dopaminu a Bz-dopaminu-D_4 (Obr. 43). Výsledná 30% koncentrace AcN byla tedy po následné úpravě chromatografické separace zavedena do optimalizovaného pracovního postupu extrakce a LC-MS analýzy různých tkání včely medonosné za účelem kvantifikace vybraných BAs (dopamin, oktopamin a histamin).

Pro poslední krok derivatizace (ukončení benzoylační reakce posunem pH do kyselé oblasti) byla tedy zvolena 1% H_2SO_4 v 50% AcN. Dále byl upraven objem 0,1% FA, ve kterém dochází vždy k resuspenzi odpařeného extraktu biologického vzorku. Objem byl z původních 50 µl zvýšen na 100 µl za účelem snadnějšího rozpuštění odparku (viz následující kapitola – 6.3.7).

6.3.5 Optimalizovaný pracovní protokol zpracování vybraných částí těla včely medonosné (*Apis mellifera*) za účelem kvantifikace BAs dopaminu, oktopaminu a histaminu

Po kompletaci optimalizačního postupu extrakce a následného zpracování biologického materiálu sestávajícího z různých částí a tkání těla včely medonosné byl navržen protokol shrnující tento postup za účelem kvantifikace tří vybraných BAs (dopamin, oktopamin, histamin), který je vhodný nejen pro druh *Apis mellifera*, ale i ostatní druhy hmyzu. Níže je vyobrazeno detailní schéma celého pracovního postupu od zpracování biologického materiálu po měření a kvantifikaci jednotlivých biogeních aminů (Obr. 44).



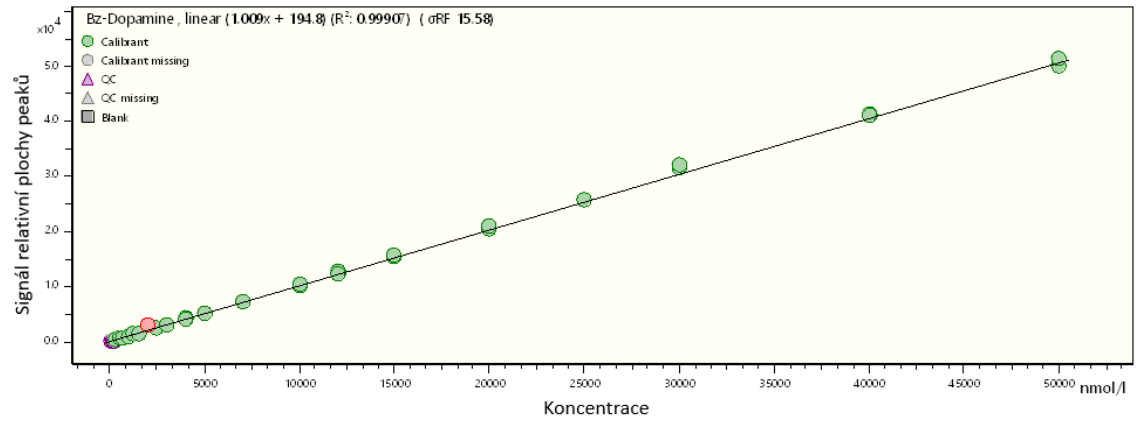
Obrázek 44: Schéma optimalizovaného postupu zpracování biologického materiálu pro detekci vybraných BAs – dopamin, oktopamin, histamin – z různých tkání včely medonosné, ale i ostatních druhů hmyzu (TT – trávicí trakt; IS* – interní standardy; TRV – „total-recovery“ vialky; BzCl – benzoylchlorid; RP-HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie v reverzní fázi; MS/MS – tandemová hmotnostní spektrometrie; Q-TOF – hybridní hmotnostní analyzátor složený z kvadrupólu a „time-of-flight“ analyzátoru); obrázek včely převzat z: Shutterstock, Inc., 2023.

Konečné schéma optimalizovaného pracovního postupu extrakce a LC-MS analýzy vzorků různých tkání *Apis mellifera* za účelem kvantifikace dopaminu, oktopaminu a histaminu (Obr. 44) je stěžejním a finálním výsledkem experimentální části práce, k jehož kompletaci byly orientovány všechny dílčí experimenty. Tento pracovní protokol je vhodný pro zpracování různých tkání včely medonosné, ale i ostatního hmyzu a obsahuje optimalizovaný postup práce začínající disekcí jedince, na kterou navazuje extrakce a derivatizace extraktu, a končící HPLC-MS/MS analýzou derivatizovaného vzorku. V konečné fázi experimentální části práce byly prostřednictvím tohoto protokolu za účelem ověření jeho platnosti kvantifikovány vybrané biologické vzorky složené z různých tkání včel chovaných za specifických podmínek.

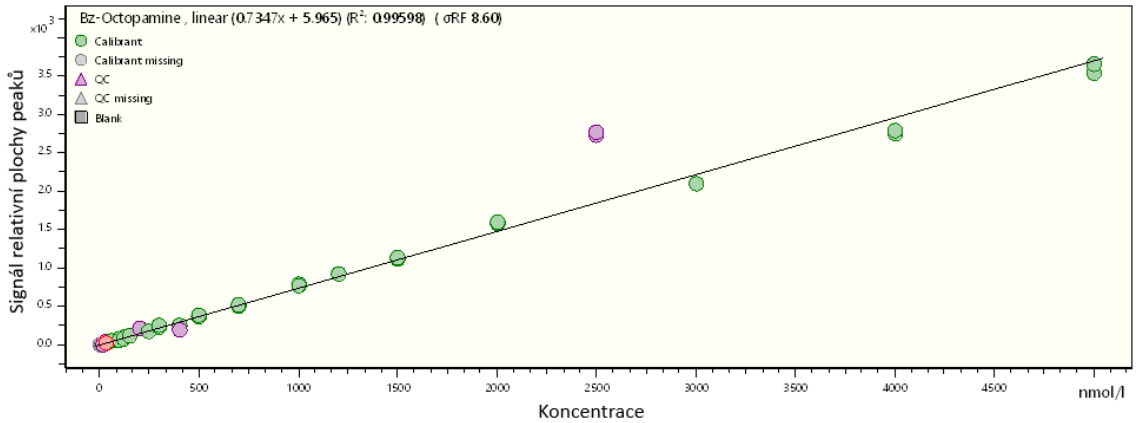
6.4 Měření a kvantifikace derivatizovaných vzorků

6.4.1 KALIBRAČNÍ KŘIVKY

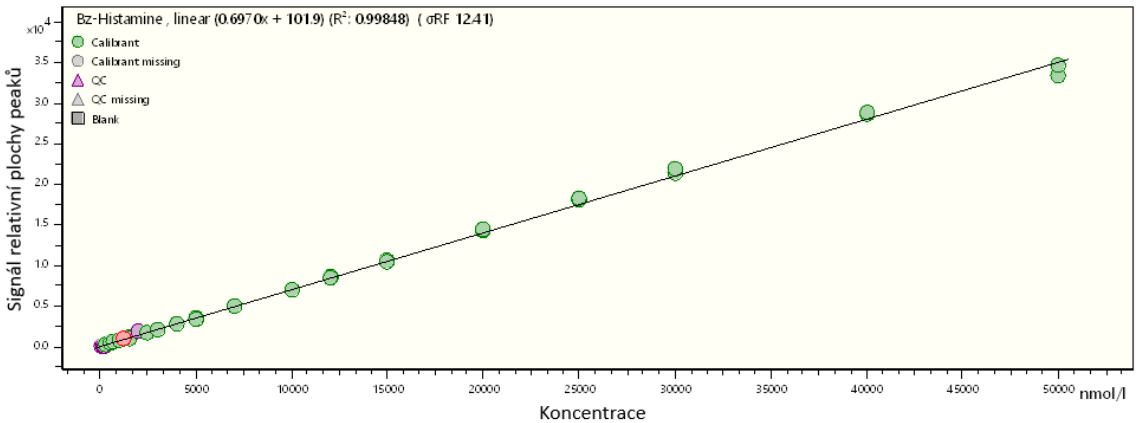
Pro extrakci v 90% AcN s 0,01% FA byly zhotoveny kalibrační křivky BAs Bz-dopaminu, Bz-oktopaminu a Bz-histaminu složené z 24 bodů podle tabulky (Tab. 6). Všechny tři kalibrační křivky (Obr. 45; 46; 47) byly využity ke kvantifikaci vzorků vybraných částí těla včel, přičemž některé z nich byly podrobeny externím stresovým podmínkám.



Obrázek 45: Kalibrační křivka Bz-dopaminu pro extrakci v 90% AcN s 0,01% FA.



Obrázek 46: Kalibrační křivka Bz-oktopaminu pro extrakci v 90% AcN s 0,01% FA.

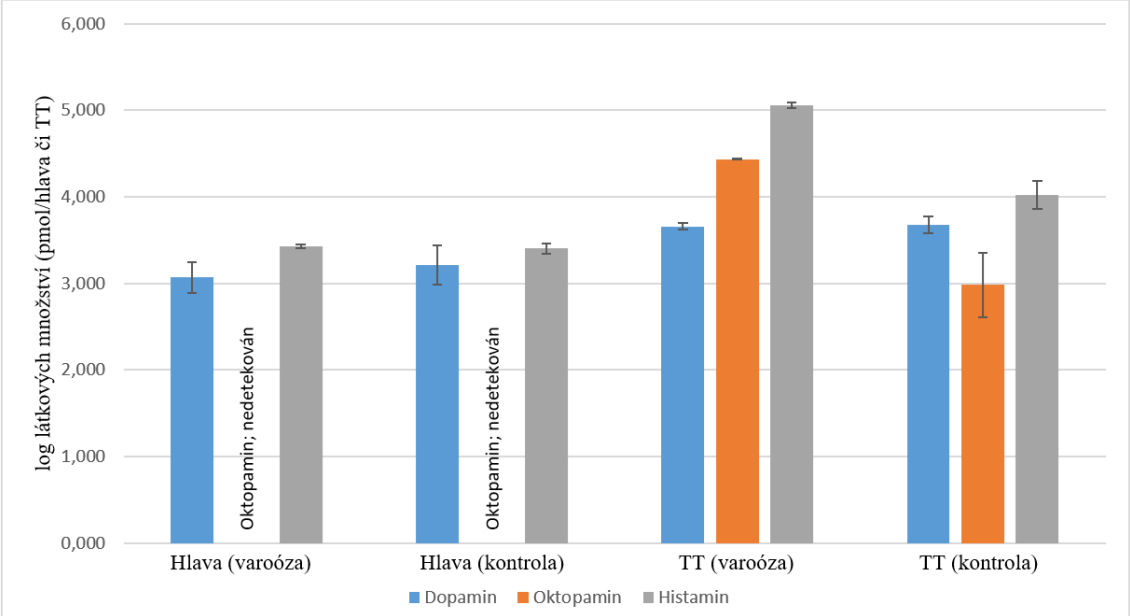


Obrázek 47: Kalibrační křivka Bz-histaminu pro extrakci v 90% AcN s 0,01% FA.

Ze vzniklých kalibračních křivek Bz-dopaminu (Obr. 45) s lineární regresí $y = 1{,}009x + 194{,}8$ ($R^2 = 0{,}99907$), Bz-oktopaminu (Obr. 46) s lineární regresí $y = 0{,}7347x + 5{,}965$ ($R^2 = 0{,}99598$) a Bz-histaminu (Obr. 47) s lineární regresí $y = 0{,}697x + 101{,}9$ ($R^2 = 0{,}99848$) bylo možné tyto BAs kvantifikovat v biologických vzorcích různých tkání včel. Dopamin, oktopamin a histamin byly kvantifikovány v jedné hlavě, nebo TT včel medonosných chovaných za specifických podmínek – včely silně infestované kleštíkem včelím (*Varroa destructor*) a včely vystavené účinku nespecifického herbicidu PQ. Hlava, či TT *Apis mellifera* představovaly vždy jeden vzorek. Závěrečným experimentem bylo stanovení látkového množství zvolených BAs v jedové žláze (jedna žláza na vzorek) a ve vzorcích lyofilizovaného včelího jedu o vzrůstající hmotnostní koncentraci ve vzorku u včel bez specifického ošetření.

6.4.2 KVANTIFIKACE VE VYBRANÝCH VZORCÍCH VČEL TRPÍCÍCH VAROÓZOU

Při kvantifikaci dopaminu, oktopaminu a histaminu bylo použito včel silně infestovaných kleštíkem včelím (*Varroa destructor*) a včel kontrolních (ze včelstev nenapadených kleštíkem), které byly dodány vedoucím práce. Kvantifikace a výpočet látkových množství ve vzorcích probíhaly prostřednictvím kalibračních křivek (Obr. 45; 46; 47). Jeden vzorek byl připraven extrakcí jedné hlavy, či TT *Apis mellifera*. Takto vypreparované vzorky byly extrahovány v 90% AcN s 0,01% FA a výslednou 30% koncentrací AcN v měřené směsi. Naměřená látková množství BAs vztažená na konkrétní část těla (hlava, TT) včel jsou uvedena v grafu (Obr. 48).



Obrázek 48: Srovnání dekadických logaritmů průměrů látkových množství (včetně *SD*) BAs dopaminu, oktopaminu a histaminu v hlavě a TT včel infestovaných kleštíkem včelím (*Varroa destructor*) a včel kontrolních (ze včelstva nenapadeného kleštíkem) – měřeno vždy v triplikátu vzorků; experiment probíhal v souladu s optimalizovaným protokolem extrakce a HPLC-MS/MS analýzy biologického vzorku pro kvantifikaci dopaminu, oktopaminu a histaminu (Obr. 44).

Z výsledků (Obr. 48) je patrné, že u včel napadených kleštíkem včelím došlo k nárůstu látkového množství oktopaminu a histaminu především v TT. Pro kvantifikované BAs v různých tkáních včel byl proveden *t*-test (Tab. 7).

Tabulka 7: Změny v hladinách vybraných BAs v hlavě a TT včel infestovaných kleštíkem včelím a zdravých včel (nenapadených kleštíkem včelím); porovnání bylo provedeno formou t-testu, každý ze vzorků byl měřen v triplikátu.

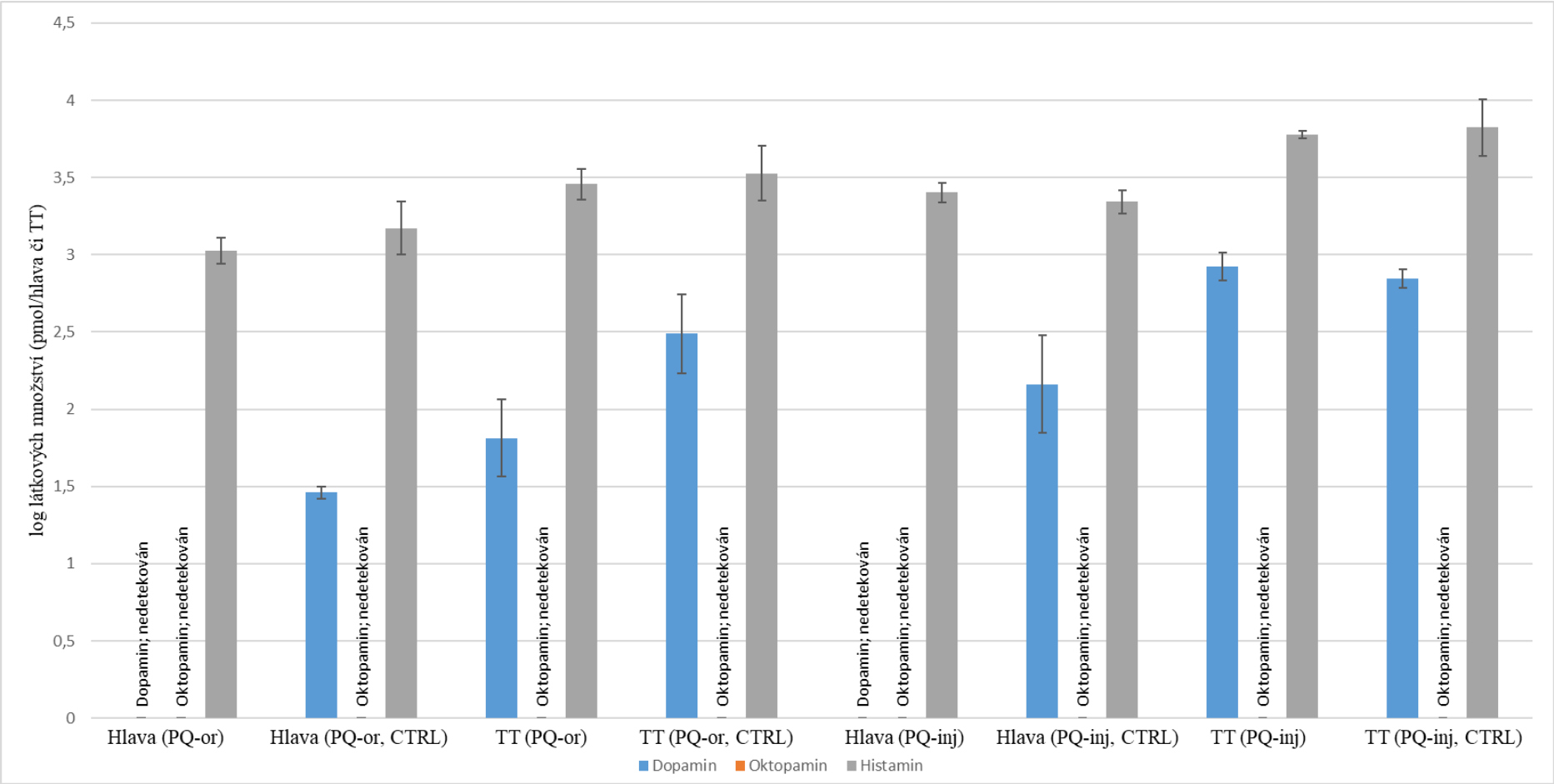
Analyt	Tělní část a skupiny	Aritmetický průměr ± *SD* (pmol)	*p*-hodnota	Statisticky významný rozdíl (α = 0,05)
Dopamin	Hlava (varoóza)	1 169,55 ± 520,46	0,4980	Ne
	Hlava (kontrola)	1619,50 ± 678,26		
	TT (varoóza)	4 565,58 ± 378,13	0,8774	Ne
	TT (kontrola)	4 763,50 ± 1 067,65		
Oktopamin	TT (varoóza)	27 219,10 ± 293,40	0,0008	Ano
	TT (kontrola)	958,50 ± 667,70		
Histamin	Hlava (varoóza)	2 686,75 ± 142,40	0,5456	Ne
	Hlava (kontrola)	5 522,45 ± 322,27		
	TT (varoóza)	228 941,50 ± 17 268,25	0,0065	Ano
	TT (kontrola)	10 488,23 ± 3676,33		

Dle provedeného *t*-testu (Tab. 7) nevykazovala látková množství dopaminu kontrolních a napadených včel statisticky významné rozdíly. Ve všech vzorcích včelích hlav se nacházel oktopamin v nedetekovatelné koncentraci, a to nejspíše z důvodu jeho velmi nízkého či žádného zastoupení v této tělní části. Na základě testu bylo prokázáno,

že se hladině významnosti (α = 5 %) liší látkové množství oktopaminu a histaminu v TT včel po napadení kleštíkem včelím a v TT včel zdravých. Toto zjištění koresponduje se skutečností, že oba zmíněné BAs hrají významnou roli v imunitní reakci, která je způsobena napadením jedince cizorodou látkou či patogenem (Nässel, 1999; Adamo, 2010).

6.4.3 KVANTIFIKACE VE VYBRANÝCH VZORCÍCH VČEL OŠETŘENÝCH NESPECIFICKÝM HERBICIDEM PQ

Při kvantifikaci vybraných BAs bylo použito včel dodaných vedoucím práce, které byly již dříve ošetřeny nespecifickým herbicidem PQ. Včelám byl tento herbicid podáván buď orálně (krmení roztokem PQ o koncentraci 10 $mmol.dm^{-3}$), či injekčně (koncentrace PQ 11,7 $pmol.dm^{-3}$) a následně byly porovnávány s příslušnými kontrolními skupinami včel ze stejného včelstva. BAs byly kvantifikovány ve vzorcích (dle kalibračních křivek: Obr. 45; 46; 47), přičemž každý vzorek byl připraven extrakcí buď jedné hlavy, či TT včely medonosné v 90% AcN s 0,01% FA (30% AcN v měřené směsi). Naměřená množství BAs v různých částech těla (hlava, TT) jsou uvedena v grafu (Obr. 49).



Obrázek 49: Srovnání dekadických logaritmů průměrů látkových množství (včetně *SD*) BAs dopaminu, oktopaminu a histaminu v hlavě a TT včel ošetřených nespecifickým herbicidem PQ – orálně (or), nebo injekčně (inj) – a včel kontrolních (CTRL – chovaných za standardních podmínek bez přítomnosti herbicidu) – měřeno vždy v triplikátu vzorků; experiment probíhal v souladu s optimalizovaným protokolem extrakce a HPLC-MS/MS analýzy biologického vzorku pro kvantifikaci dopaminu, oktopaminu a histaminu (Obr. 44).

Pro výsledky měření zanesené v grafu (Obr. 49) byl proveden *t*-test za účelem zjištění, zda mají rozdíly v hladinách BAs v hlavě a TT včel ošetřených PQ a včel zdravých statistický význam (Tab. 8).

Tabulka 8: Změny v hladinách vybraných BAs v hlavě a TT včel ošetřených nespecifickým herbicidem PQ a zdravých včel (neošetřených PQ); porovnání bylo provedeno formou t-testu, každý ze vzorků byl měřen v triplikátu.

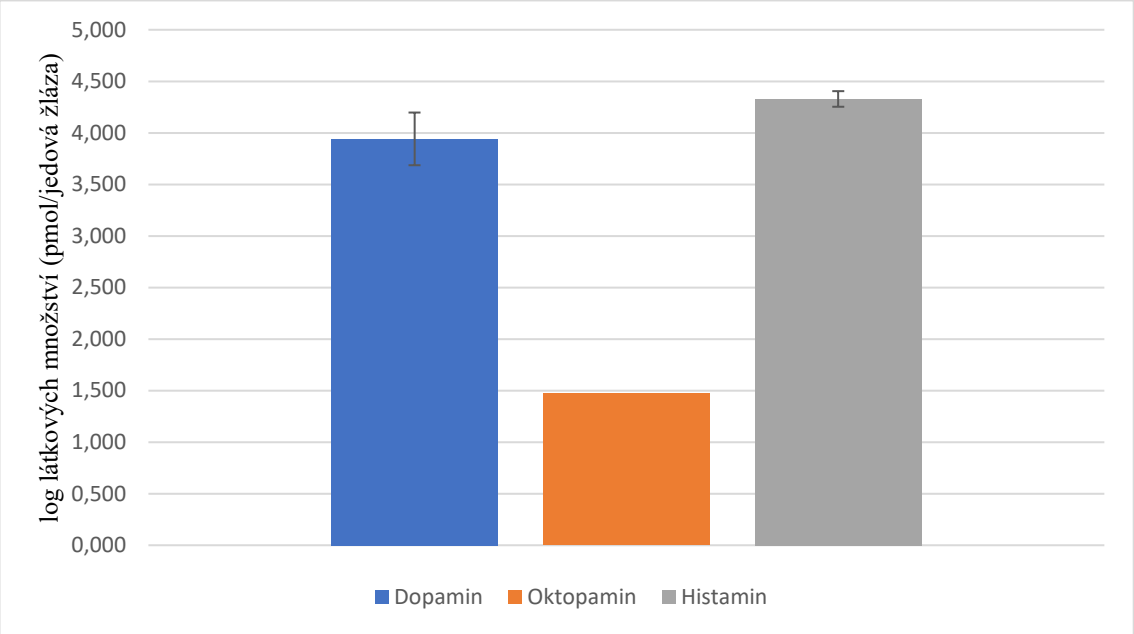
Analyt	Tělní část a skupiny	Aritmetický průměr ± *SD* (pmol)	*p*-hodnota	Statisticky významný rozdíl (α = 0,05)
Dopamin	Hlava (PQ-or)	0,00	0,0007	Ano
	Hlava (PQ-or, CTRL)	86,65 ± 7,85		
	TT (PQ-or)	130,27 ± 70,31	0,1557	Ne
	TT (PQ-or, CTRL)	617,00 ± 387,87		
	Hlava (PQ-inj)	0,00	0,0002	Ano
	Hlava (PQ-inj, CTRL)	391,70 ± 23,40		
	TT (PQ-inj)	2 522,05 ± 509,35	0,3452	Ne
	TT (PQ-inj, CTRL)	1 399,33 ± 1 018,90		
Histamin	Hlava (PQ-or)	1 055,00 ± 214,48	0,0625	Ne
	Hlava (PQ-or, CTRL)	1 820,93 ± 237,88		
	TT (PQ-or)	2 854,75 ± 664,67	0,0901	Ne
	TT (PQ-or, CTRL)	6 721,93 ± 2 366,22		
	Hlava (PQ-inj)	2 533,77 ± 388,28	0,4464	Ne
	Hlava (PQ-inj, CTRL)	2 206,52 ± 387,58		
	TT (PQ-inj)	8 967,53 ± 449,78	0,3799	Ne
	TT (PQ-inj, CTRL)	6 672,47 ± 2 420,00		

U včel, které byly vystaveny účinku PQ (ať už orálně, či injekčně), došlo ke statisticky významnému snížení látkového množství dopaminu v hlavové části těla, kde jsou lokalizovány dopaminergní neurony. Při orálním podání PQ došlo ke snížení látkového množství dopaminu navíc i v TT včel, toto snížení ovšem nemělo statistický význam. V případě injekčního podání PQ došlo naopak k nárůstu látkového množství dopaminu v TT. Látková množství histaminu v hlavě a TT ošetřených a kontrolních včel se výrazným numerickým ani statistickým způsobem nelišila. Látková množství oktopaminu se v tomto experimentu nacházela v nedetekovatelné hladině nejspíše z důvodu nízké koncentrace ve vzorcích.

6.4.4 KVANTIFIKACE VE VZORCÍCH VČEL OBSAHUJÍCÍCH JEDOVOU ŽLÁZU, NEBO VČELÍ JED

V tomto experimentu byla provedena kvantifikace dopaminu, oktopaminu a histaminu v odlišných biologických vzorcích včely medonosné, kdy byla stanovena látková množství vybraných BAs v jedné jedové žláze včely na vzorek a dále v řadě sestupných

koncentrací rozpuštěného lyofilizovaného včelího jedu v 0,1% FA (5 sestupně řazených hmotnostních koncentrací jedu v extrahovaném vzorku: od 10 000 $mg.dm^{-3}$ do 1 $mg.dm^{-3}$). Jedové žlázy a lyofilizovaný včelí jed byly odebrány ze včel, které nebyly ošetřeny žádným specifickým způsobem a byly dodány vedoucím práce. Kvantifikaci BAs v uvedených biologických vzorcích pomocí HPLC-MS/MS metody předcházela jejich extrakce v 90% AcN s 0,01% FA (výsledná 30% koncentrace AcN ve vialkách připravených k měření). V grafu jsou zaneseny výsledky kvantifikace BAs v jedových žlázách včel (Obr. 50) a v tabulce jsou zobrazeny výsledky kvantifikace BAs v lyofilizovaném včelím jedu o různých koncentracích (Tab. 9).



Obrázek 50: Srovnání dekadických logaritmů průměrů látkových množství (včetně *SD*) BAs dopaminu, oktopaminu a histaminu v jedové žláze včel, které byly chovány bez specifického ošetření – měření probíhalo s pěti vzorky (jeden vzorek byl složen z jedné jedové žlázy); pro oktopamin byl získán pouze jeden výsledek z jediného vzorku (z toho důvodu pro tento analyt není v grafu uvedena ani *SD*); experiment probíhal v souladu s optimalizovaným protokolem extrakce a HPLC-MS/MS analýzy biologického vzorku pro kvantifikaci dopaminu, oktopaminu a histaminu (Obr. 44).

Tabulka 9: Přehled látkových množství BAs dopaminu, oktopaminu a histaminu v 1 g lyofilizovaného jedu včel, které byly chovány bez specifického ošetření – měření probíhalo s pěti vzorky různě naředěného včelího jedu; experiment probíhal v souladu s optimalizovaným protokolem extrakce a HPLC-MS/MS analýzy biologického vzorku pro kvantifikaci dopaminu, oktopaminu a histaminu (Obr. 44).

Typ vzorku (koncentrace)	Dopamin – množství (pmol) v 1 g jedu	Oktopamin – množství (pmol) v 1 g jedu	Histamin – množství (pmol) v 1g jedu
Jed (10 000 mg.dm^{-3})	1104,7	0,00	6396,6
Jed (1 000 mg.dm^{-3})	819,6	0,00	6692,0
Jed (100 mg.dm^{-3})	0,00	0,00	5952,0
Jed (10 mg.dm^{-3})	0,00	0,00	0,00
Jed (1 mg.dm^{-3})	0,00	0,00	0,00

Z grafu (Obr. 50) je patrné, že jedové žlázy včel obsahují značné množství dopaminu a především histaminu – oba tyto BAs jsou totiž součástí včelího jedu (Pucca *et al*., 2019). Oktopamin byl kvantifikován pouze v jediném případě jedové žlázy včely, což mohlo být způsobeno jeho nízkým látkovým množstvím ve vzorku (pod měřitelnou hladinou). V souladu s optimalizovaným pracovním protokolem (Obr. 44) byl zpracován i lyofilizovaný včelí jed, který byl naředěn na pět koncentrací snižujících se sestupně – 10 000 mg.dm^{-3}, 1 000 mg.dm^{-3}, 100 mg.dm^{-3}, 10 mg.dm^{-3} a 1 mg.dm^{-3}. Při analýze včelího jedu (Tab. 9) byl kvantifikován dopamin pouze ve dvou nejvyšších hmotnostních koncentracích lyofilizovaného včelího jedu (10 000 mg.dm^{-3} a 1 000 mg.dm^{-3}). Histamin byl navíc kvantifikován i v hmotnostní koncentraci lyofilizovaného včelího jedu 100 mg.dm^{-3}. Látková množství dopaminu a histaminu se v méně koncentrovaných roztocích lyofilizovaného včelího jedu nacházela v nedetekovatelné hladině. Výsledná množství dopaminu a histaminu jsou uvedená v nmol.g^{-1} lyofilizovaného včelího jedu (dopamin 24,05 ± 3,56 nmol.g^{-1}; histamin 158,67 ± 7,60 nmol.g^{-1}). Látková množství oktopaminu se v roztocích lyofilizovaného včelího jedu nacházela v nedetekovatelné hladině nejspíše opět z důvodu nízkého obsahu analytu ve vzorku.

7 DISKUSE

Oproti dříve používané detekční metodě BAs z biologického vzorku založené na HPLC-ECD se HPLC-MS/MS analýza vyznačuje četnými přednostmi. Některými z nich jsou zkrácení doby samotné analýzy, snížení limitu detekce, odstranění interference analytů, které mohou být navíc strukturně rozmanitější než u HPLC-ECD analýzy a zvýšení specifity, následně i selektivity detekce – z uvedených důvodů postupně dostává při detekci BAs a jiných molekul přednost HPLC-MS/MS analýza před HPLC-ECD (de Jong *et al*., 2011; Bedia Erim, 2013; Grinias *et al*., 2017; Zhang *et al*., 2020).

Při separaci pomocí HPLC v reverzní fázi je problémem polarita BAs i jiných analytů, které následně nevykazují požadovanou retenci v chromatografické koloně, což je problém z toho důvodu, že se samotnými analyty dochází k extrakci mnoha polárních molekul, jakými jsou například různé soli či sacharidy. Tyto vysoce polární molekuly se poté eluují spolu s analyty polárního charakteru (včetně BAs) a způsobují zvýšení matricových efektů ve vzorku vyúsťující ve snižování účinnosti ionizace a samotného MS signálu při kvantifikaci BAs (Kuehnbaum a Britz-McKibbin, 2013; Grinias *et al*., 2017). Derivatizace vzorku nepolární skupinou výrazně eliminuje tento problém, jelikož zvyšuje retenci BAs v chromatografické koloně s uspořádáním v reverzní fázi. Dochází tedy ke zvýšení separační schopnosti kolony, což vede ke zvýšení účinnosti ionizace při HPLC-MS/MS analýze (Grinias *et al*., 2017). Dalšími výhodami derivatizace jsou zvýšení těkavosti analytu, jeho tepelné stability a navýšení citlivosti a selektivity při jeho detekci a kvantifikaci (van der Jagt, 2013). Redmondem a Tsengem (1979) byla jako první popsána derivatizace BAs pomocí činidla BzCl. Dřívější postupy detekce a kvantifikace BAs založené především na HPLC-ECD analýze, či HPLC analýze s detekcí v UV oblasti (HPLC-UV) využívaly derivatizaci právě pomocí tohoto činidla (Thaw *et al*., 2004; Özdestan a Üren, 2009; Aflaki *et al*., 2014).

Novější přístupy k detekci a kvantifikaci BAs však přinesly i postupy, které derivatizaci do postupu nezařazují (Li *et al*., 2020; Zhang *et al*., 2020; Davla *et al*., 2023). Zhang *et al*. (2020) ve své práci popisuje úspěšný postup extrakce BAs ve vodě bez následné derivatizace ze vzorků včelího jedu (separace pomocí RP-HPLC a detekce ESI-MS/MS analýzou s QqQ). Ve studii Davly *et al.* (2023) byl popsán extrakční postup BAs z cerebrálního ganglionu octomilky (*Drosophila melanogaster*) pomocí činidla složeného z EtOH a vody o objemovém poměru 1:9 také bez využití derivatizace (RP-HPLC separace a kvantifikace pomocí ESI-MS/MS s QqQ). Experiment

provedeným Li *et al*. (2020) byl založen na extrakci BAs ze vzorku složeného z celého jedince druhu *Plutella xylostella* s využitím 0,1 mol.dm^{-3} $HClO_4$ (kombinace separační metody RP-HPLC a kvantifikační metody HESI-MS/MS s lineárním hybridním hmotnostním analyzátorem složeným z iontové pasti a orbitální pasti).

Derivatizace vzorku totiž může přinášet komplikace, zejména dochází ke zvýšení ztrát analytu, tvorbě nepožadovaných produktů analytu po derivatizační reakci a potenciálně delší postup přípravy spojený s jeho rozšířením o přípravu derivatizovaného produktu (Papageorgiou *et al*., 2018; Munir a Badri, 2020). Proto byl zvolen výchozí metodikou postup izolace, chromatografické separace v reverzní fázi (ARION® Polar C18, Chromservis, s.r.o., Česká republika) a detekce pomocí hybridního hmotnostního spektrometru (MS/MS compact Q-TOF, Bruker Daltonik, Německo) bez provedení derivatizační reakce vzorků. Byly optimalizovány způsoby extrakce, kdy byla porovnána různá extrakční činidla a jako nejvhodnější byla zvolena kombinace 80% MeOH s 0,1% TFA. Takto adaptovaná metoda ovšem vedla k problémům, kdy docházelo k příliš brzké eluci polárních BAs spolu s ostatními vysoce polárními sloučeninami (například různé soli a sacharidy obsažené v biologickém materiálu), které byly extrahovány spolu s analyty. Současná eluce nízkomolekulárních látek spolu s BAs komplikovala hmotnostně spektrometrickou analýzu z důvodu zvýšení matricových efektů v měřeném vzorku (Grinias *et al*., 2017), což se nepodařilo vyřešit. Ve vzorcích byl tedy kvantifikován pouze histamin, nicméně množství dopaminu a oktopaminu se nacházela v nedetekovatelné hladině. Vliv matricových efektů na detekci BAs v biologických vzorcích ve své práci popisují Ramesh a Brockmann (2019) a Duan *et al*. (2022), nicméně experimenty stanovující množství BAs v hlavové části zástupců hmyzu využívají převážně biologických vzorků složených pouze z cerebrálního ganglionu jedince (Wagener-Hulme *et al*., 1999; Ramesh a Brockmann, 2019; Davla *et al*., 2023) – při homogenizaci celé hlavy může tedy docházet ke značnému ovlivnění výsledků v souvislosti s přítomností velkého množství balastních látek.

Z důvodu předešlých komplikací bylo přistoupeno k derivatizačnímu procesu pomocí BzCl. Protokol využívající BzCl jako derivatizační činidlo vycházel z práce Griniase *et al*. (2017), přičemž jako nejvhodnější extrakční činidlo byl zvolen 90% AcN s 0,01% FA. Na extrakci navazovala zmíněná derivatizační reakce s následnou chromatografickou separací v reverzní fázi (RAPTOR C18, Restek, USA) a kvantifikací pomocí hybridního hmotnostního spektrometru (MS/MS compact Q-TOF, Bruker Daltonik, Německo).

Optimalizována byla i volba MF chromatografické separace, kdy byla na základě studie Johnsona *et al*. (2013) a Čajky *et al*. (2023) zvolena MF o složení: MF A (0,01 mol.dm^{-3} mravenčan amonný v 0,1% FA ve vodě) a MF B (0,1% FA v AcN). V závislosti na zmíněném postupu byl vypracován optimalizovaný protokol zpracování různých tkání včel za účelem detekce BAs dopaminu, oktopaminu a histaminu, který byl optimalizován pro dopamin a histamin. Při detekci oktopaminu především v hlavové části těla *Apis mellifera* vyvstávaly problémy způsobené nejspíše nízkým obsahem analytu ve vzorku, či jeho ztrátám v izolačním postupu. Dalším faktorem mohlo být nízké množství oktopaminu v této tělní části.

Dlouhodobé vystavení účinku herbicidu PQ může mít vliv na zvýšení pravděpodobnosti propuknutí neurodegenerativních chorob a zvýšení frekvence potíží správného fungování CNS u hmyzu. PQ působí nepřímo degeneraci a postupnou ztrátu dopaminergních neuronů, což u takového jedince posléze vyústí ve snížení tvorby a distribuce především dopaminu (Cassar *et al*., 2015). Výsledky měření v této práci potvrdily uvedené tvrzení. Hladina dopaminu v hlavě i TT včel byla snížena při orálním podání PQ, ovšem při injekčním podání PQ došlo ke snížení množství dopaminu pouze v TT včel. To souvisí nejspíše se způsobem podání PQ, kdy při orálním podání putoval herbicid přímo do TT, ale při injekčním podání byl podán do hrudní části těla včel (nutné je také zmínit rozdílné koncentrace PQ v případě orálního a injekčního podání, kdy orálně byl PQ podáván mnohem více koncentrovaný).

V souvislosti se stresovými podmínkami hmyzu provedl Newland *et al*. (2015) experiment, v němž vystavil jedince rodu *Drosophila* statickému elektrickému poli. Hladina dopaminu byla s prodlužující se dobou vystavení elektrickému poli signifikantně snížena, oproti tomu docházelo za stejných podmínek k mírnému zvýšení hladiny oktopaminu. Při porovnávání s obdobnými studiemi však nebyly nalezeny experimenty stanovující množství BAs v hlavě a TT takto specificky ošetřených včel (včelstva napadené varoózou, či ošetřené nespecifickým herbicidem PQ). Nicméně byla porovnána hladina dopaminu a histaminu alespoň v rámci studií, ve kterých byly tyto BAs kvantifikovány v cerebrálním ganglionu dělnic v různém stádiu jejich vývoje, přičemž bylo zjištěno, že látková množství obou aminů naměřená v této práci několikanásobně převyšují data naměřená v ostatních studiích (Wagener-Hulme *et al*., 1999; Sasaki a Nagao, 2001; Beggs et al., 2007; Ramesh a Brockmann, 2019; Sasaki *et al*., 2020; Davla *et al*., 2023). Podstatně vyšší množství BAs je způsobeno složením vzorku, kdy v této

práci bylo použito celých včelích hlav, ale ve zmíněných studiích byly testovány vzorky pouhých cerebrálních ganglionů. V práci Zhanga *et al*. (2020) byla popsána kvantifikace dopaminu a histaminu ve vzorcích včelího jedu vybraných poddruhů *Apis mellifera*, přičemž výsledné množství dopaminu a histaminu v jedu těchto poddruhů včel bylo vyšší než naměřené množství daných BAs v této práci. To může být způsobeno rozdílným složením včelího jedu v závislosti na druhu, stáří, stádiu vývoje a stresorech včelích jedinců (Abd El-Wahed *et al*., 2019).

8 ZÁVĚR

V předložené práci byly v teoretické části popsány biologické funkce dopaminu, oktopaminu a histaminu a jejich tkáňový výskyt v těle včely medonosné (*Apis mellifera*) a ostatních druzích hmyzu. To zahrnovalo nejprve popis anatomie hmyzího mozku s lokalizací tkání zodpovědných za produkci příslušných BAs. Následně byla popsána chemická struktura BAs a rozdíly v jejich výskytu u bezobratlých živočichů a obratlovců. Obsáhlá kapitola byla věnována receptorům BAs, kde byly také specifikovány signální dráhy spojené s přenosem signálu zprostředkovaného GPCRs, jež jsou aktivovány BAs. Kapitola byla následně zaměřena na receptory dopaminu, oktopaminu a histaminu v hmyzím těle a funkce plynoucí z jejich aktivace. Rešerše obsahuje také detailní specifikaci metabolismu zmíněných tří BAs počínající biosyntézou a končící jejich degradací. V předložené práci byl také kladen důraz na shrnutí metodického zpracování BAs v minulých letech, a to v rámci celého postupu zpracování – pojednáno bylo o způsobech extrakce, derivatizace, separace a kvantifikace vzorku obsahujícího požadované analyty.

Experimentální část byla rozdělena do dvou hlavních kapitol vyobrazující přístupy ke zpracování různých tkání včely medonosné – postup bez derivatizace a s derivatizací vzorku. Takto byla vedena i metodická část práce, kdy jsou popsány odlišné postupy zpracování hlavy, TT, jedové žlázy a jedu včel. Při zpracování vzorku bez využití derivatizace bylo zvoleno činidla složeného z 80% MeOH s 0,1% TFA, pomocí kterého byl vzorek extrahován. Následně byl separován na chromatografické koloně ARION® Polar C18 v reverzní fázi a jeho kvantifikace probíhala prostřednictvím hmotnostně spektrometrické analýzy na přístroji Compact qTOF s využitím ESI. V rámci experimentální části diplomové práce bylo zjištěno, že původní postup bez derivatizace poskytuje neuspokojivé výsledky kvantifikace BAs. Z toho důvodu byl původní postup opuštěn a zvolen byl alternativní postup zahrnující derivatizaci. Extrakce vzorku s následnou derivatizací byla založena na použití činidla sestávajícího z 90% AcN s 0,01% FA, vzorek byl poté podroben derivatizační reakci s využitím BzCl a detekován s využitím HPLC-MS/MS analýzy. Při ní byla kombinována chromatografická separace na koloně Restek RAPTOR C18 v reverzní fázi opět s MS/MS analýzou na přístroji Compact qTOF.

Dílčí experimenty postupu zpracování vzorku s jeho následnou derivatizací zahrnující optimalizaci MF, porovnání různých extrakčních činidel, optimalizaci extrakčních

podmínek a koncentrace AcN v analyzované směsi daly vzniknout optimalizovanému pracovnímu protokolu zpracování vybraných částí těla včely medonosné za účelem kvantifikace BAs (dopamin, oktopamin a histamin), který může být použit i pro analogické biologické vzorky a BAs (Obr. 44). Metodu zpracování se podařilo ve srovnání s původní metodou i při začlenění derivatizačního kroku do postupu výrazně zkrátit (přibližně ze dvou pracovních dnů na jeden). Protokol byl ověřen na vzorcích hlavy, TT, jedové žlázy a jedu včel chovaných za různých podmínek s cílem ověřit, zda je vyvinutou metodou možné analyzovat různé tkáně a také zjistit, jak se mění koncentrace BAs v těle včel při různých podmínkách. BAs byly kvantifikovány v koncentračním rozmezí desítek až stovek nmol na vzorek hlavy, TT a jedové žlázy včel, nebo na 1 g lyofilizovaného včelího jedu.

V rámci této diplomové práce byl vyvinut a optimalizován protokol extrakce a HPLC-MS/MS analýzy pro kvantifikaci dopaminu, oktopaminu a histaminu. Dopamin i histamin byl detekován ve včelích tkáních, zatímco oktopamin byl detekován a kvantifikován pouze v omezeném počtu biologických vzorků. Vyvinutý protokol umožňuje detekovat a kvantifikovat BAs, ovšem pro jeho finální ověření je ještě potřeba jej validovat. Zavedení metody do laboratorní praxe by následně znamenalo příspěvek k rozšíření znalostí o vlivu BAs na imunitu a chování různých druhů hmyzu a k rozvoji výzkumu imunity včel, jakožto hlavního opylovače rostlin.

9 LITERATURA

Abd El-Wahed,A.A., Khalifa,S.A.M., Sheikh,B.Y., Farag,M.A., Saeed A., Larik F.A., Koca-Caliskan U., AlAjmi M.F., Hassan M., Wahabi H.A., Hegazy M.-E.F., Algethami A.F., Büttner S. a El-Seedi H.R. (2019): Bee Venom Composition: From Chemistry to Biological Activity. In: *Studies in Natural Products Chemistry*. Vol. 60, (Atta-ur-Rahman), Elsevier, Londýn, Velká Británie, 459-484 (DOI: kapitola: 10.1016/B978-0-444-64181-6.00013-9; ISBN: kniha: 978-0-444-64181-6).

Adamo S.A. (2010): Why should an immune response activate the stress response? Insights from the insects (the cricket *Gryllus texensis*). *Brain, Behavior, and Immunity* **24**, 194-200 (DOI: 10.1016/j.bbi.2009.08.003).

Aflaki F., Ghoulipour V., Saemian N. a Salahinejad M. (2014): A simple method for benzoyl chloride derivatization of biogenic amines for high performance liquid chromatography. *Analytical Methods* **6**, 1482-1487 (DOI: 10.1039/c3ay41830h).

Akashi H.D., Chen P.J., Akiyama T., Terai Y., Wakakuwa M., Takayama Y., Tominaga M., Arikawa K. (2018): Physiological responses of ionotropic histamine receptors, *PxHCLA* and *PxHCLB*, to neurotransmitter candidates in a butterfly, *Papilio xuthus*. *Journal of Experimental Biology* **221**, jeb183129 (DOI: 10.1242/jeb.183129).

Alekseyenko O.V., Chan Y.-B., Li R. a Kravitz E.A. (2013): Single dopaminergic neurons that modulate aggression in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 6151-6156 (DOI: 10.1073/pnas.1303446110).

Andersen S.O. (2010): Insect cuticular sclerotization: A review. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **40**, 166-178 (DOI: 10.1016/j.ibmb.2009.10.007).

Armstrong G.A.B., Shoemaker K.L., Money T.G.A. a Robertson R.M. (2006): Octopamine Mediates Thermal Preconditioning of the Locust Ventilatory Central Pattern Generator via a cAMP/Protein Kinase A Signaling Pathway. *Journal of Neuroscience* **26**, 12118-12126 (DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3347-06.2006).

Aso Y., Herb A., Ogueta M., Siwanowicz I., Templier T., Friedrich A.B., Ito K., Scholz H., Tanimoto H. a Rulifson E. (2012): Three Dopamine Pathways Induce Aversive Odor Memories with Different Stability. *PLoS Genetics* **8**, e1002768 (DOI: 10.1371/journal.pgen.1002768).

Aurora Biomed Inc.: A Breakdown of Liquid-Liquid Extraction and Solid-Phase Extractionhttps. Vancouver, B.C., Kanada (https://www.aurorabiomed.com/a-breakdown-of-liquid-liquid-extraction-and-solid-liquid-extraction/ – cit. 9. 3. 2023).

Bai H. a Palli S.R. (2016): Identification of G protein-coupled receptors required for vitellogenin uptake into the oocytes of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Scientific Reports* **6**, 27648 (DOI: 10.1038/srep27648).

Balfanz S., Strünker T., Frings S. a Baumann A. (2005): A family of octopamine receptors that specifically induce cyclic AMP production or Ca^{2+} release in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Neurochemistry* **93**, 440-451 (DOI: 10.1111/j.1471-4159.2005.03034.x).

Bang S., Hyun S., Hong S.-T., Kang J., Jeong K., Park J.-J., Choe J., Chung J. a Rulifson E. (2011): Dopamine Signalling in Mushroom Bodies Regulates Temperature-Preference Behaviour in *Drosophila*. *PLoS Genetics* **7**, e1001346 (DOI: 10.1371/journal.pgen.1001346).

Barnes J.S., Nguyen H.P., Shen S. a Schug K.A. (2009): General method for extraction of blueberry anthocyanins and identification using high performance liquid chromatography-electrospray ionization-ion trap-time of flight-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1216**, 4728-4735 (DOI: 10.1016/j.chroma.2009.04.032).

Baumann E. (1886): Über eine einfache Methode der Darstellung von Benzoësäureäthern. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **19**, 3218-3222 (DOI: 10.1002/cber.188601902348).

Bedia Erim F. (2013): Recent analytical approaches to the analysis of biogenic amines in food samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **52**, 239-247 (DOI: 10.1016/j.trac.2013.05.018).

Beggs K.T. a Mercer A.R. (2009): Dopamine Receptor Activation By Honey Bee Queen Pheromone. *Current Biology* **19**, 1206-1209 (DOI: 10.1016/j.cub.2009.05.051).

Beggs K.T., Glendining K.A., Marechal N.M., Vergoz V., Nakamura I., Slessor K.N. a Mercer A.R. (2007): Queen pheromone modulates brain dopamine function in worker honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 2460-2464 (DOI: 10.1073/pnas.0608224104).

Beggs K.T., Tyndall J.D.A., Mercer A.R. a Hansen I.A. (2011): Honey Bee Dopamine and Octopamine Receptors Linked to Intracellular Calcium Signaling Have a Close Phylogenetic and Pharmacological Relationship. *PLoS ONE* **6**, e26809 (DOI: 10.1371/journal.pone.0026809).

Blenau W. (2005): Preface: Cellular actions of biogenic amines. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **59**, 99-102 (DOI: 10.1002/arch.20072).

Blenau W. a Baumann A. (2001): Molecular and pharmacological properties of insect biogenic amine receptors: Lessons from *Drosophila melanogaster* and *Apis mellifera*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **48**, 13-38 (DOI: 10.1002/arch.1055).

Borycz J.A., Borycz J., Kubów A., Kostyleva R. a Meinertzhagen I.A. (2005): Histamine Compartments of the *Drosophila* Brain With an Estimate of the Quantum Content at the Photoreceptor Synapse. *Journal of Neurophysiology* **93**, 1611-1619 (DOI: 10.1152/jn.00894.2004).

Britannica, The Editors of Encyclopaedia (2022): "histamine". *Encyclopedia Britannica*. Chicago, USA (https://www.britannica.com/science/histamine – cit. 8. 1. 2023).

Buchner E., Buchner S., Burg M.G., Hofbauer A., Pak W.L. a Pollack I. (1993): Histamine is a major mechanosensory neurotransmitter candidate in *Drosophila melanogaster*. *Cell and Tissue Research* **273**, 119-125 (DOI: 10.1007/BF00304618).

Burg M.G., Sarthy P.V., Koliantz G. a Pak W.L. (1993): Genetic and molecular identification of a *Drosophila* histidine decarboxylase gene required in photoreceptor transmitter synthesis. *The EMBO Journal* **12**, 911-919 (DOI: 10.1002/j.1460-2075.1993.tb05732.x).

Carter J.E., Johnson J.H. a Baaske D.M. (1982): Dopamine Hydrochloride. In: *Analytical Profiles of Drug Substances*. Vol. 11, 1st ed., (Florey K.), Elsevier, Londýn, Velká Británie, 257-272 (DOI kapitola: 10.1016/S0099-5428(08)60266-X; ISBN kniha: 978-0-12-260811-7).

Cassar M., Issa A.-R., Riemensperger T., Petitgas C., Rival T., Coulom H., Iché-Torres M., Han K.-A. a Birman S. (2015): A dopamine receptor contributes to paraquat-induced neurotoxicity in *Drosophila*. *Human Molecular Genetics* **24**, 197-212 (DOI: 10.1093/hmg/ddu430).

Cazzamali G., Klaerke D.A. a Grimmelikhuijzen C.J.P. (2005): A new family of insect tyramine receptors. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **338**, 1189-1196 (DOI: 10.1016/j.bbrc.2005.10.058).

Cole S.H., Carney G.E., McClung C.A., Willard S.S., Taylor B.J. a Hirsh J. (2005): Two Functional but Noncomplementing *Drosophila* Tyrosine Decarboxylase Genes. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 14948-14955 (DOI: 10.1074/jbc.M414197200).

Comas-Basté O., Sánchez-Pérez S., Veciana-Nogués M.T., Latorre-Moratalla M. a Vidal-Carou M. del C. (2020): Histamine Intolerance: The Current State of the Art. *Biomolecules* **10**, 1-26 (DOI: 10.3390/biom10081181).

Cook C.N., Brent C.S., Breed M.D. (2017): Octopamine and tyramine modulate the thermoregulatory fanning response in honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Experimental Biology* **15**, 1925-1930 (DOI: 10.1242/jeb.149203).

Crocker A. a Sehgal A. (2008): Octopamine Regulates Sleep in *Drosophila* through Protein Kinase A-Dependent Mechanisms. *Journal of Neuroscience* **28**, 9377-9385 (DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3072-08a.2008).

Čajka T., Hricko J., Rudl Kulhavá L., Paučová M., Nováková M. a Kuda O. (2023): Optimization of Mobile Phase Modifiers for Fast LC-MS-Based Untargeted Metabolomics and Lipidomics. *International Journal of Molecular Sciences* **24**, 1987 (DOI: 10.3390/ijms24031987).

Davla S., Daly E., Nedow J., Gritsas A., Curran L., Taylor L. a van Meyel D.J. (2023): An LC-MS/MS method for simultaneous analysis of up to six monoamines from brain tissues. *Journal of Chromatography B* **1216**, 123604 (DOI: 10.1016/j.jchromb.2023.123604).

de Jong W.H.A., de Vries E.G.E. a Kema I.P. (2011): Current status and future developments of LC-MS/MS in clinical chemistry for quantification of biogenic amines. *Clinical Biochemistry* **44**, 95-103 (DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2010.07.006).

Downer R.G.H., Gole J.W.D. a Orr G.L. (1985): Interaction of formamidines with octopamine-, dopamine- and 5-hydroxytryptamine-sensitive adenylate cyclase in the nerve cord of *Periplaneta americana*. *Pesticide Science* **16**, 472-478 (DOI: 10.1002/ps.2780160505).

Du Y., Wang Q., Yang G. A Han F. (2022): Determination of 43 pesticide residues in intact grape berries (*Vitis Vinifera L.*) by using an ultrasound-assisted acetonitrile extraction method followed by LC–MS/MS. *Food Control* **140**, 109123 (DOI: 10.1016/j.foodcont.2022.109123).

Duan Q.-L., Shi H.-W., Tan L., Liu Z., Huang Q., Shen W., Cao L., Lee H.K. a Tang S. (2022): Ultrahigh-Performance Supercritical Fluid Chromatography and Detection of Multiple Biogenic Amines in Gentamicin Sulfate: Method Development Using Computer-Assisted Modeling. *Analytical Chemistry* **94**, 7229-7237 (DOI: 10.1021/acs.analchem.2c00325).

Enan E.E. (2005): Molecular and pharmacological analysis of an octopamine receptor from american cockroach and fruit fly in response to plant essential oils. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **59**, 161-171 (DOI: 10.1002/arch.20076).

Erdag D., Merhan O. a Yildiz B. (2019): Biochemical and Pharmacological Properties of Biogenic Amines. In: *Biogenic Amines*. 1st ed., (Proestos C.), IntechOpen, Londýn, Velká Británie, 32-45 (DOI: kapitola: 10.5772/intechopen.81569; ISBN: kniha: 978-1-83962-090-4).

Erspamer V. (1948): Active Substances in the Posterior Salivary Glands of *Octopoda*. II. Tyramine and Octopamine (Oxyoctopamine). *Acta Pharmacologica et Toxicologica* **4**, 224-247 (DOI: 10.1111/j.1600-0773.1948.tb03345.x).

Evans P.D. (1980): Biogenic Amines in the Insect Nervous System. In: *Advances in Insect Physiology*. Vol. 15, 1st ed., (Berridge M.J., Treherne J.E., Wigglesworth V.B.), Elsevier, Cambridge, Velká Británie, 317-473 (DOI: kapitola: 10.1016/S0065-2806(08)60143-5; ISBN: kniha: 9780080579115).

Evans P.D. a Maqueira B. (2005): Insect octopamine receptors: a new classification scheme based on studies of cloned *Drosophila* G-protein coupled receptors. *Invertebrate Neuroscience* **5**, 111-118 (DOI: 10.1007/s10158-005-0001-z).

Evans P.D., Bayliss A. a Reale V. (2014): GPCR-mediated rapid, non-genomic actions of steroids: Comparisons between DmDopEcR and GPER1 (GPR30). *General and Comparative Endocrinology* **195**, 157-163 (DOI: 10.1016/j.ygcen.2013.10.015).

Evans P.D., Davenport A.P., Elias M.S., Morton D.B. a Trimmer B.A. (1985): Assays for Biogenic Amines in Insect Nervous Tissue. In: *Neurochemical Techniques in Insect Research*. 1st ed., (Breer H., Miller T.A.), Springer, Berlin, Heidelberg, Německo, 25-46 (DOI: kapitola: 10.1007/978-3-642-70045-3_2; ISBN: kniha: 978-3-642-70045-3).

Fan Y., Richard F.-J., Rouf N. a Grozinger C.M. (2010): Effects of queen mandibular pheromone on nestmate recognition in worker honeybees, *Apis mellifera*. *Animal Behaviour* **79**, 649-656 (DOI: 10.1016/j.anbehav.2009.12.013).

Farris S.M., Robinson G.E. a Fahrbach S.E. (2001): Experience- and Age-Related Outgrowth of Intrinsic Neurons in the Mushroom Bodies of the Adult Worker Honeybee. *The Journal of Neuroscience* **21**, 6395-6404 (DOI: 10.1523/JNEUROSCI.21-16-06395.2001).

Field L.H., Duch C. a Pflüger H.-J. (2008): Responses of efferent octopaminergic thoracic unpaired median neurons in the locust to visual and mechanosensory signals. *Journal of Insect Physiology* **54**, 240-254 (DOI: 10.1016/j.jinsphys.2007.09.006).

García-Valcárcel A.I. a Tadeo J.L. (2009): A combination of ultrasonic assisted extraction with LC–MS/MS for the determination of organophosphorus pesticides in sludge. *Analytica Chimica Acta* **641**, 117-123 (DOI: 10.1016/j.aca.2009.03.046).

Gengs C., Leung H.-T., Skingsley D.R., Iovchev M.I., Yin Z., Semenov E.P., Burg M.G., Hardie R.C. a Pak W.L. (2002): The Target of *Drosophila* Photoreceptor Synaptic Transmission Is a Histamine-gated Chloride Channel Encoded byort (hclA). *Journal of Biological Chemistry* **277**, 42113-42120 (DOI: 10.1074/jbc.M207133200).

Gervan N.L., Winston M.L., Higo H.A. a Hoover S.E.R. (2005): The effects of honey bee (*Apis mellifera*) queen mandibular pheromone on colony defensive behaviour. *Journal of Apicultural Research* **44**, 175-179 (DOI: 10.1080/00218839.2005.11101175).

Gervasi N., Tchénio P. a Preat T. (2010): PKA Dynamics in a *Drosophila* Learning Center: Coincidence Detection by Rutabaga Adenylyl Cyclase and Spatial Regulation by Dunce Phosphodiesterase. *Neuron* **65**, 516-529 (DOI: 10.1016/j.neuron.2010.01.014).

Gisselmann G., Pusch H., Hovemann B.T. a Hatt H. (2002): Two cDNAs coding for histamine-gated ion channels in *D. melanogaster*. *Nature Neuroscience* **5**, 11-12 (DOI: 10.1038/nn787).

Gorman M.J. a Arakane Y. (2010): Tyrosine hydroxylase is required for cuticle sclerotization and pigmentation in *Tribolium castaneum*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **40**, 267-273 (DOI: 10.1016/j.ibmb.2010.01.004).

Grinias J.P, Wong J.-M.T. a Nesbitt K.M. (2017): Using Benzoyl Chloride Derivatization to Improve Small-Molecule Analysis in Biological Samples by LC–MS/MS. *LGGC North America* **35**, 760-768 (DOI: neuvedeno; Dostupné z webové stránky: https://www.chromatographyonline.com/view/using-benzoyl-chloride-derivatization-improve-small-molecule-analysis-biological-samples-lc-msms-0 – cit. 2. 3. 2023).

Grohmann L., Blenau W., Erber J., Ebert P.R., Strünker T. a Baumann A. (2003): Molecular and functional characterization of an octopamine receptor from honeybee (*Apis mellifera*) brain. *Journal of Neurochemistry* **86**, 725-735 (DOI: 10.1046/j.1471-4159.2003.01876.x).

Gruntenko N., Chentsova N.A., Bogomolova E.V., Karpova E.K., Glazko G.V., Faddeeva N.V., Monastirioti M. a Rauschenbach I.Y. (2004): The effect of mutations altering biogenic amine metabolism in *Drosophila* on viability and the response to environmental stresses. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **55**, 55-67 (DOI: 10.1002/arch.10123).

Harano K.I., Sasaki M., Nagao T. a Sasaki K. (2008): Dopamine influences locomotor activity in honeybee queens: implications for a behavioural change after mating. *Physiological Entomology* **33**, 395-399 (DOI: 10.1111/j.1365-3032.2008.00644.x).

Hardie R.C. (1987): Is histamine a neurotransmitter in insect photoreceptors?. *Journal of Comparative Physiology A* **161**, 201-213 (DOI: 10.1007/BF00615241).

Hardie R.C. (1989): A histamine-activated chloride channel involved in neurotransmission at a photoreceptor synapse. *Nature* **339**, 704-706 (DOI: 10.1038/339704a0).

Harris J.W. a Woodring J. (1995): Elevated brain dopamine levels associated with ovary development in queenless worker honey bees (*Apis mellifera L.*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* **111**, 271-279 (DOI: 10.1016/0742-8413(95)00048-S).

Hauser F., Cazzamali G., Williamson M., Blenau W. a Grimmelikhuijzen C.J.P. (2006): A review of neurohormone GPCRs present in the fruitfly *Drosophila melanogaster* and the honey bee *Apis mellifera*. *Progress in Neurobiology* **80**, 1-19 (DOI: 10.1016/j.pneurobio.2006.07.005).

Hawach Scientific: About The Features and Different Types of SPE Cartridges. Xi´an, Provincie Shaanxi, Čína (https://www.specartridge.com/about-the-features-and-different-types-of-spe-cartridges/ – cit. 9. 3. 2023).

Herrmann K.M. a Weaver L.M. (1999): THE SHIKIMATE PATHWAY. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**, 473-503 (DOI: 10.1146/annurev.arplant.50.1.473).

Hewlett S.E., Delahunt Smoleniec J.D., Wareham D.M., Pyne T.M., Barron A.B. a Dyer A.G. (2018): Biogenic amine modulation of honey bee sociability and nestmate affiliation. *PLOS ONE* **13**, e0205686 (DOI: 10.1371/journal.pone.0205686).

Hill C.A., Doyle T., Nuss A.B., Ejendal K.F.K., Meyer J.M. a Watts V.J. (2016): Comparative pharmacological characterization of D1-like dopamine receptors from *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* suggests pleiotropic signaling in mosquito vector lineages. *Parasites & Vectors* **9**, 1-6 (DOI: 10.1186/s13071-016-1477-6).

Himmelreich S., Masuho I., Berry J.A., MacMullen C., Skamangas N.K., Martemyanov K.A. a Davis R.L. (2017): Dopamine Receptor DAMB Signals via Gq to Mediate Forgetting in *Drosophila*. *Cell Reports* **21**, 2074-2081 (DOI: 10.1016/j.celrep.2017.10.108).

Hirashima A., Ueno R. a Eto M. (1992): Effects of various stressors on larval growth and whole-body octopamine levels of *Tribolium castaneum*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **44**, 217-225 (DOI: 10.1016/0048-3575(92)90092-E).

Hornero-Méndez D. a Garrido-Fernández A. (1994): Biogenic amines in table olives. Analysis by high-performance liquid chromatography. *The Analyst* **119**, 2037-2041 (DOI: 10.1039/AN9941902037).

Huang J., Ohta H., Inoue N., Takao H., Kita T., Ozoe F. a Ozoe Y. (2009): Molecular cloning and pharmacological characterization of a *Bombyx mori* tyramine receptor selectively coupled to intracellular calcium mobilization. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **39**, 842-849 (DOI: 10.1016/j.ibmb.2009.10.001).

Chase D.L. a Koelle M.R. (2007): Biogenic amine neurotransmitters in *C. elegans*. *WormBook* **20**, 1-15 (DOI: 10.1895/wormbook.1.132.1).

Chen Y.-L., Hung Y.-S. a Yang E.-C. (2008): Biogenic amine levels change in the brains of stressed honeybees. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **68**, 241-250 (DOI: 10.1002/arch.20259).

Chuang T.T., Iacovelli L., Sallese M. a De Blasi A. (1996): G protein-coupled receptors: heterologous regulation of homologous desensitization and its implications. *Trends in Pharmacological Sciences* **17**, 416-421 (DOI: 10.1016/S0165-6147(96)10048-1).

Insausti T.C. a Lazzari C.R. (2021): Anatomy of the Nervous System of *Triatomines*. In: *Triatominae – The Biology of Chagas Disease Vectors* (Entomology in Focus; online), vol 5, (Guarneri A., Lorenzo M.), Springer, Cham, Švýcarsko, 123-144 (DOI kapitola: 10.1007/978-3-030-64548-9; ISBN kniha: 978-3-030-64548-9).

Ismail N., Robinson G.E. a Fahrbach S.E. (2006): Stimulation of muscarinic receptors mimics experience-dependent plasticity in the honey bee brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 207-211 (DOI: 10.1073/pnas.0508318102).

Jarriault D. a Mercer A.R. (2012): Queen mandibular pheromone: questions that remain to be resolved. *Apidologie* **43**, 292-307 (DOI: 10.1007/s13592-011-0117-6).

Johnson D., Boyes B. a Orlando R. (2013): The Use of Ammonium Formate as a Mobile-Phase Modifier for LC-MS/MS Analysis of Tryptic Digests. *Journal of Biomolecular Techniques: JBT* **24**, 187-197 (DOI: 10.7171/jbt.13-2404-005).

Karovičová J. a Kohajdová Z. (2005): Biogenic Amines in Food. *ChemInform* **36**, 70-79 (DOI: 10.1002/chin.200534338).

Khan M.A.A., Nakane T., Ohta H. a Ozoe Y. (2003): Positive and negative modulation of *Bombyx mori* adenylate cyclase by 5-phenyloxazoles: Identification of octopamine and tyramine receptor agonists. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **52**, 7-16 (DOI: 10.1002/arch.10058).

Kissinger P.T., Refshauge C., Dreiling R. a Adams R.N. (1973): An Electrochemical Detector for Liquid Chromatography with Picogram Sensitivity. *Analytical Letters* **6**, 465-477 (DOI: 10.1080/00032717308058694).

Kodrík, D. (2014): Hormony a hormonální řízení antistresové odpovědi u hmyzu. Živa **62**, 206-208 (ISSN: 0044-4812).

Kuehnbaum N.L. a Britz-McKibbin P. (2013): New Advances in Separation Science for Metabolomics: Resolving Chemical Diversity in a Post-Genomic Era. *Chemical Reviews* **113**, 2437-2468 (DOI: 10.1021/cr300484s).

Kutchko K.M. a Siltberg-Liberles J. (2013): *Metazoan* innovation: from aromatic amino acids to extracellular signaling. *Amino Acids* **45**, 359-367 (DOI: 10.1007/s00726-013-1509-x).

Lagisz M., Mercer A.R., de Mouzon C., Santos L.L.S. a Nakagawa S. (2016): Association of Amine-Receptor DNA Sequence Variants with Associative Learning in the Honeybee. *Behavior Genetics* **46**, 242-251 (DOI: 10.1007/s10519-015-9749-z).

Lange J., Thomas K. a Wittmann C. (2002): Comparison of a capillary electrophoresis method with high-performance liquid chromatography for the determination of biogenic amines in various food samples. *Journal of Chromatography B* **779**, 229-239 (DOI: 10.1016/S1570-0232(02)00372-0).

Lee H.-G., Seong C.-S., Kim Y.-C., Davis R.L. a Han K.-A. (2003): Octopamine receptor OAMB is required for ovulation in *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology* **264**, 179-190 (DOI: 10.1016/j.ydbio.2003.07.018).

Li F., Li K., Wu L.-J., Fan Y.-L. a Liu T.-X. (2020): Role of Biogenic Amines in Oviposition by the Diamondback Moth, *Plutella xylostella L. Frontiers in Physiology* **11**, 00475 (DOI: 10.3389/fphys.2020.00475).

Lima M.A.P., Cutler G.C., Mazzeo G. A Hrnčíř M. (2022): Editorial: The decline of wild bees. *Frontiers in Ecology and Evolution* **10**, 1027169 (DOI: 10.3389/fevo.2022.1027169).

Loos M., Gerber C., Corona F., Hollender J. a Singer H. (2015): Accelerated Isotope Fine Structure Calculation Using Pruned Transition Trees. *Analytical Chemistry* **87**, 5738-5744 (DOI: 10.1021/acs.analchem.5b00941; URL webu s platformou pro výpočet hodnot m/z: https://www.envipat.eawag.ch/index.php – cit. 9. 3. 2023).

Maebe K., Vereecken N.J., Piot N., Reverté S., Cejas D., Michez D., Vandamme P. a Smagghe G. (2021): The Holobiont as a Key to the Adaptation and Conservation of Wild Bees in the Anthropocene. *Frontiers in Ecology and Evolution* **9**, 781470 (DOI: 10.3389/fevo.2021.781470).

Malec P.A. (2018): Derivatization Methods for Improved Metabolome Analysis by LC-MS/MS. Disertační práce. The University od Michigan, Ann Arbor – Michigan, USA.

Maqueira B., Chatwin H. a Evans P.D. (2005): Identification and characterization of a novel family of *Drosophila* β-adrenergic-like octopamine G-protein coupled receptors. *Journal of Neurochemistry* **94**, 547-560 (DOI: 10.1111/j.1471-4159.2005.03251.x).

Mašek P. a Keene A.C. (2016): Gustatory processing and taste memory in *Drosophila*. *Journal of Neurogenetics* **30**, 112-121 (DOI: 10.1080/01677063.2016.1185104).

Melzig J., Buchner S., Wiebel F., Wolf R., Buchner E., Burg M. a Pak W.L. (1996): Genetic depletion of histamine from the nervous system of *Drosophila* eliminates specific visual and mechanosensory behavior. *Journal of Comparative Physiology A* **179**, 763-773 (DOI: 10.1007/BF00207355).

Mentel T., Duch C., Stypa H., Wegener G., Müller U. a Pflüger H.-J. (2003): Central Modulatory Neurons Control Fuel Selection in Flight Muscle of Migratory Locust. *The Journal of Neuroscience* **23**, 1109-1113 (DOI: 10.1523/JNEUROSCI.23-04-01109.2003).

Meyer J.M., Ejendal K.F.K., Avramova L.V., Garland-Kuntz E.E., Giraldo-Calderón G.I., Brust T.F., Watts V.J., Hill C.A. a Dinglasan R.R. (2012): A "Genome-to-Lead" Approach for Insecticide Discovery: Pharmacological Characterization and Screening of *Aedes aegypti* D1-like Dopamine Receptors. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **6**, e1478 (DOI: 10.1371/journal.pntd.0001478).

Mizunami M. a Matsumoto Y. (2017): Roles of Octopamine and Dopamine Neurons for Mediating Appetitive and Aversive Signals in Pavlovian Conditioning in Crickets. *Frontiers in Physiology* **8**, A1027 (DOI: 10.3389/fphys.2017.01027).

Molognoni L., Daguer H., de Sá Ploêncio L.A. a De Dea Lindner J. (2018): A multi-purpose tool for food inspection: Simultaneous determination of various classes of preservatives and biogenic amines in meat and fish products by LC-MS. *Talanta* **178**, 1053-1066 (DOI: 10.1016/j.talanta.2017.08.081).

Monastirioti M., Linn Jr. C.E. a White K. (1996): Characterization of *Drosophila* Tyramine β-Hydroxylase Gene and Isolation of Mutant Flies Lacking Octopamine. *The Journal of Neuroscience* **16**, 3900-3911 (DOI: 10.1523/JNEUROSCI.16-12-03900.1996).

Moret S. a Conte L.S. (1996): High-performance liquid chromatographic evaluation of biogenic amines in foods an analysis of different methods of sample preparation in relation to food characteristics. *Journal of Chromatography A* **729**, 363-369 (DOI: 10.1016/0021-9673(95)00961-2).

Munir M.A. a Badri K.H. (2020): The Importance of Derivatizing Reagent in Chromatography Applications for Biogenic Amine Detection in Food and Beverages. *Journal of Analytical Methods in Chemistry* **2020**, 1-14 (DOI: 10.1155/2020/5814389).

Nässel D. R (1999): Histamine in the brain of insects: a review. *Microscopy Research and Technique* **44**, 121-136 (DOI: 10.1002/(SICI)1097-0029(19990115/01)44:2/3<121::AID-JEMT6>3.0.CO;2-F).

Newland P.L., Al Ghamdi M.S., Sharkh S., Aonuma H. a Jackson C.W. (2015): Exposure to static electric fields leads to changes in biogenic amine levels in the brains of *Drosophila*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **282**, 20151198 (DOI: 10.1098/rspb.2015.1198).

Noda K., Saad Y., Graham R.M. a Karnik S.S. (1994): The high affinity state of the beta 2-adrenergic receptor requires unique interaction between conserved and non-conserved extracellular loop cysteines. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 6743-6752 (DOI: 10.1016/S0021-9258(17)37438-0).

Nuñez M., del Olmo A. a Calzada J. (2016): Biogenic Amines. In: *Encyclopedia of Food and Health*. 1st ed., (Caballero B., Finglas P.M., Toldrá F.), Elsevier, Waltham, Velká Británie, 416-423 (DOI: kapitola: 10.1016/B978-0-12-384947-2.00070-2; ISBN: kniha: 9780123849533).

Ott S.R. a Rogers S.M. (2010): Gregarious desert locusts have substantially larger brains with altered proportions compared with the solitarious phase. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **277**, 3087-3096 (DOI: 10.1098/rspb.2010.0694).

Owald D. a Waddell S. (2015): Olfactory learning skews mushroom body output pathways to steer behavioral choice in *Drosophila*. *Current Opinion in Neurobiology* **35**, 178-184 (DOI: 10.1016/j.conb.2015.10.002).

Özdestan Ö. a Üren A. (2009): A method for benzoyl chloride derivatization of biogenic amines for high performance liquid chromatography. *Talanta* **78**, 1321-1326 (DOI: 10.1016/j.talanta.2009.02.001).

Palczewski K., Kumasaka T., Hori T., Behnke C.A., Motoshima H., Fox B.A., Trong I.L., Teller D.C., Okada T., Stenkamp R.E., Yamamoto M. a Miyano M. (2000): Crystal Structure of Rhodopsin: A G-Protein-Coupled Receptor. *Science* **289**, 739-745 (DOI: 10.1126/science.289.5480.739).

Papageorgiou M., Lambropoulou D., Morrison C., Namieśnik J. a Płotka-Wasylka J. (2018): Direct solid phase microextraction combined with gas chromatography – Mass spectrometry for the determination of biogenic amines in wine. *Talanta* **183**, 276-282 (DOI: 10.1016/j.talanta.2018.02.006).

Paulk A.C., Stacey J.A., Pearson T.W.J., Taylor G.J., Moore R.J.D., Srinivasan M.V. a van Swinderen B. (2014): Selective attention in the honeybee optic lobes precedes behavioral choices. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, 5006-5011 (DOI: 10.1073/pnas.1323297111).

Pawar R.S., Grundel E., Fardin-Kia A.R. a Rader J.I. (2014): Determination of selected biogenic amines in *Acacia rigidula* plant materials and dietary supplements using LC–MS/MS methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **88**, 457-466 (DOI: 10.1016/j.jpba.2013.09.012).

Pizzutti I.R., de Kok A., Hiemstra M., Wickert C. a Prestes O.D. (2009): Method validation and comparison of acetonitrile and acetone extraction for the analysis of 169 pesticides in soya grain by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1216**, 4539-4552 (DOI: 10.1016/j.chroma.2009.03.064).

Potter C.J. a Luo L. (2008): Octopamine fuels fighting flies. *Nature Neuroscience* **11**, 989-990 (DOI: 10.1038/nn0908-989).

PubChem (2023a): Dopamine. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). National Center for Biotechnology Information. (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dopamine – cit. 14. 3. 2023).

PubChem (2023b): Benzoyl chloride. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Benzoyl-chloride – cit. 14. 3. 2023).

PubChem (2023c): Octopamine. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Octopamine – cit. 14. 3. 2023).

PubChem (2023d): Histamine. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Histamine – cit. 14. 3. 2023).

Pucca M.B., Cerni F.A., Oliveira I.S., Jenkins T.P., Argemí L., Sørensen C.V., Ahmadi S., Barbosa J.E. a Laustsen A.H. (2019): Bee Updated: Current Knowledge on Bee Venom and Bee Envenoming Therapy. *Frontiers in Immunology* **10**, 02090 (DOI: 10.3389/fimmu.2019.02090).

Ramesh D. a Brockmann A. (2019): Mass Spectrometric Quantification of Arousal Associated Neurochemical Changes in Single Honey Bee Brains and Brain Regions. *ACS Chemical Neuroscience* **10**, 1950-1959 (DOI: 10.1021/acschemneuro.8b00254).

Ramirez-Cruz M.P., Rayburn W.F. a Seifert S.A. (2022): Envenomations and antivenom during pregnancy. In: *Clinical Pharmacology During Pregnancy* (online), 2 nd ed., (Mattison D. R.), Elsevier, Londýn, Velká Británie, 389-408 (DOI kapitola: 10.1016/B978-0-12-818902-3.00011-7; ISBN kniha: 978-0-12-386007-1).

Ranganathan R., Cannon S.C. a Horvitz H.R. (2000): MOD-1 is a serotonin-gated chloride channel that modulates locomotory behaviour in *C. elegans*. *Nature* **408**, 470-475 (DOI: 10.1038/35044083).

Reale V., Hannan F., Midgley J.M. a Evans P.D. (1997): The expression of a cloned *Drosophila* octopamine/tyramine receptor in *Xenopus* oocytes. *Brain Research* **769**, 309-320 (DOI: 10.1016/S0006-8993(97)00723-3).

Redmond J.W. a Tseng A. (1979): High-pressure liquid chromatographic determination of putrescine, cadaverine, spermidine and spermine. *Journal of Chromatography A* **170**, 479-481 (DOI: 10.1016/S0021-9673(00)95481-5).

Rillich J. a Stevenson P.A. (2014): A fighter's comeback: Dopamine is necessary for recovery of aggression after social defeat in crickets. *Hormones and Behavior* **66**, 696-704 (DOI: 10.1016/j.yhbeh.2014.09.012).

Roeder T. (2005): TYRAMINE AND OCTOPAMINE: Ruling Behavior and Metabolism. *Annual Review of Entomology* **50**, 447-477 (DOI: 10.1146/annurev.ento.50.071803.130404).

Rotte C., Krach C., Balfanz S., Baumann A., Walz B. a Blenau W. (2009): Molecular characterization and localization of the first tyramine receptor of the American cockroach (*Periplaneta americana*). *Neuroscience* **162**, 1120-1133 (DOI: 10.1016/j.neuroscience.2009.05.066).

Santos M.H.S. (1996): Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology* **29**, 213-231 (DOI: 10.1016/0168-1605(95)00032-1).

Sarthy P.V. (1991): Histamine: A Neurotransmitter Candidate for *Drosophila* Photoreceptors. *Journal of Neurochemistry* **57**, 1757-1768 (DOI: 10.1111/j.1471-4159.1991.tb06378.x).

Sasaki K. a Nagao T. (2001): Distribution and levels of dopamine and its metabolites in brains of reproductive workers in honeybees. *Journal of Insect Physiology* **47**, 1205-1216 (DOI: 10.1016/S0022-1910(01)00105-6).

Sasaki K., Harada M. a Rueppell O. (2020): Dopamine production in the brain is associated with caste-specific morphology and behavior in an artificial intermediate honey bee caste. *PLOS ONE* **15**, e0244140 (DOI: 10.1371/journal.pone.0244140).

Shalaby A.R. (1995): Multidetection, semiquantitative method for determining biogenic amines in foods. *Food Chemistry* **52**, 367-372 (DOI: 10.1016/0308-8146(95)93283-W).

Shutterstock, Inc. (2023) (https://www.shutterstock.com/cs/image-vector/honey-bee-hand-drawn-engraving-vintage-692088985 – cit. 27. 3. 2023).

Scheiner R., Plückhahn S., Öney B., Blenau W. a Erber J. (2002): Behavioural pharmacology of octopamine, tyramine and dopamine in honey bees. *Behavioural Brain Research* **136**, 545-553 (DOI: 10.1016/S0166-4328(02)00205-X).

Skingsley D.R., Laughlin S.B. a Hardie R.C. (1995): Properties of histamine-activated chloride channels in the large monopolar cells of the dipteran compound eye: a comparative study. *Journal of Comparative Physiology A* **176**, 611-623 (DOI: 10.1007/BF01021581).

Slade J.D. a Staveley B.E. (2016): Manipulation of components that control feeding behavior in *Drosophila melanogaster* increases sensitivity to amino acid starvation. *Genetics and Molecular Research* **15**, gmr.15017489 (DOI: 10.4238/gmr.15017489).

Song P., Mabrouk O.S., Hershey N.D. a Kennedy R.T. (2012): *In Vivo* Neurochemical Monitoring Using Benzoyl Chloride Derivatization and Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **84**, 412-419 (DOI: 10.1021/ac202794q).

Srivastava D.P., Yu E.J., Kennedy K., Chatwin H., Reale V., Hamon M., Smith T. a Evans P.D. (2005): Rapid, Nongenomic Responses to Ecdysteroids and Catecholamines Mediated by a Novel *Drosophila* G-Protein-Coupled Receptor. *Journal of Neuroscience* **25**, 6145-6155 (DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1005-05.2005).

Stern M. (2009): The PM1 neurons, movement sensitive centrifugal visual brain neurons in the locust: anatomy, physiology, and modulation by identified octopaminergic neurons. *Journal of Comparative Physiology A* **195**, 123-137 (DOI: 10.1007/s00359-008-0392-5).

Strader C.D., Fong T.M., Grazlano M.P. a Tota M.R. (1995): The family of G-protein-coupled receptors. *The FASEB Journal* **9**, 745-754 (DOI: 10.1096/fasebj.9.9.7601339).

Stradiotto N.R., Yamanaka H. a Zanoni M.V.B. (2003): Electrochemical sensors: a powerful tool in analytical chemistry. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **14**, 159-173 (DOI: 10.1590/S0103-50532003000200003).

Sugumaran M. a Barek H. (2016): Critical Analysis of the Melanogenic Pathway in Insects and Higher Animals. *International Journal of Molecular Sciences* **17**, 1753 (DOI: 10.3390/ijms17101753).

Tanner G. a Czerwenka C. (2011): LC-MS/MS Analysis of Neonicotinoid Insecticides in Honey: Methodology and Residue Findings in Austrian Honeys. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**, 12271-12277 (DOI: 10.1021/jf202775m).

Taylor T. (2014): Reversed-Phase HPLC Mobile-Phase Chemistry – Explained. *LGGC North America* **32**, 894 (DOI: neuvedeno; Dostupné z webové stránky: https://www.chromatographyonline.com/view/reversed-phase-hplc-mobile-phase-chemistry-explained, cit. – 2. 3. 2023).

ten Brink B., Damink C., Joosten H.M.L.J. a Huis in 't Veld J.H.J. (1990): Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *International Journal of Food Microbiology* **11**, 73-84 (DOI: 10.1016/0168-1605(90)90040-C).

Thaw M., Aung O., Myint A., Bisswanger H. (2004): Determination of Biogenic Amines in Different Shrimp Species for Export. *Journal of the Myanmar Academy of Arts and Science* **5**, 51-66 (DOI: neuvedeno; Dostupné z webové stránky https://inis.iaea.org/collection/NCLCollectionStore/_Public/38/109/38109229.pdf – cit. 18. 4. 2023).

Thompson A.J., Lester H.A. a Lummis S.C.R. (2010): The structural basis of function in Cys-loop receptors. *Quarterly Reviews of Biophysics* **43**, 449-499 (DOI: 10.1017/S0033583510000168).

Thöny B., Auerbach G. a Blau N. (2000): Tetrahydrobiopterin biosynthesis, regeneration and functions. *Biochemical Journal* **347**, 1-16 (DOI: 10.1042/0264-6021:3470001).

Umek N., Geršak B., Vintar N., Šoštarič M. a Mavri J. (2018): Dopamine Autoxidation Is Controlled by Acidic pH. *Frontiers in Molecular Neuroscience* **11**, 467 (DOI: 10.3389/fnmol.2018.00467).

Unoki S., Matsumoto Y. a Mizunami M. (2006): Roles of octopaminergic and dopaminergic neurons in mediating reward and punishment signals in insect visual learning. *European Journal of Neuroscience* **24**, 2031-2038 (DOI: 10.1111/j.1460-9568.2006.05099.x).

Vale S.R. a Glória M.B.A. (1997): Determination of Biogenic Amines in Cheese. *Journal of AOAC INTERNATIONAL* **80**, 1006-1012 (DOI: 10.1093/jaoac/80.5.1006).

van der Jagt H. (2013): WATER ANALYSIS | Overview. In: *Encyclopedia of Analytical Science*. 3 rd ed., (Worsfold P., Poole C., Townshend A. a Miró M.), Elsevier, Londýn, Velká Británie, 299-324 (DOI: kapitola: 10.1016/B978-0-12-409547-2.00567-9; ISBN: kniha: 9780124095472).

van Engelsdorp D. a Meixner M.D. (2010): A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *Journal of Invertebrate Pathology* **103**, S80-S95 (DOI: 10.1016/j.jip.2009.06.011).

Vergoz V., Lim J. a Oldroyd B.P. (2012): Biogenic amine receptor gene expression in the ovarian tissue of the honey bee *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology* **21**, 21-29 (DOI: 10.1111/j.1365-2583.2011.01106.x).

Verlinden H. (2018): Dopamine signalling in locusts and other insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **97**, 40-52 (DOI: 10.1016/j.ibmb.2018.04.005).

Verlinden H., Vleugels R., Marchal E., Badisco L., Pflüger H.-J., Blenau W. a Broeck J.V. (2010): The role of octopamine in locusts and other arthropods. *Journal of Insect Physiology* **56**, 854-867 (DOI: 10.1016/j.jinsphys.2010.05.018).

Verlinden H., Vleugels R., Verdonck R., Urlacher E., Vanden Broeck J. a Mercer A. (2015): Pharmacological and signalling properties of a D2-like dopamine receptor (Dop3) in *Tribolium castaneum*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **56**, 9-20 (DOI: 10.1016/j.ibmb.2014.11.002).

Vinauger C., Lahondère C., Wolff G.H., Locke L.T., Liaw J.E., Parrish J.Z., Akbari O.S., Dickinson M.H. a Riffell J.A. (2018): Modulation of Host Learning in *Aedes aegypti* Mosquitoes. *Current Biology* **28**, 333-344.e8 (DOI: 10.1016/j.cub.2017.12.015).

Wade L. G. (2023): "alcohol". *Encyclopedia Britannica*. Chicago, USA (https://www.britannica.com/science/alcohol – cit. 24. 2. 2023).

Wagener-Hulme C., Kuehn J.C., Schulz D.J. a Robinson G.E. (1999): Biogenic amines and division of labor in honey bee colonies. *Journal of Comparative Physiology A: Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* **184**, 471-479 (DOI: 10.1007/s003590050347).

Wang Y., Jiang H., Cheng Y., An C., Chu Y., Raikhel A.S. a Zou Z. (2017): Activation of *Aedes aegypti* prophenoloxidase-3 and its role in the immune response against entomopathogenic fungi. *Insect Molecular Biology* **26**, 552-563 (DOI: 10.1111/imb.12318).

Watson D.G., Zhou P., Midgley J.M., Milligan C.D. a Kaiser K. (1993): The determination of biogenic amines in four strains of the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **11**, 1145-1149 (DOI: 10.1016/0731-7085(93)80096-J).

Westerink B.H.C. (2000): Analysis of biogenic amines in microdialysates of the brain. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **747**, 21-32 (DOI: 10.1016/S0378-4347(00)00338-8).

Wong J.-M.T., Malec P.A., Mabrouk O.S., Ro J., Dus M. a Kennedy R.T. (2016): Benzoyl chloride derivatization with liquid chromatography–mass spectrometry for targeted metabolomics of neurochemicals in biological samples. *Journal of Chromatography A* **1446**, 78-90 (DOI: 10.1016/j.chroma.2016.04.006).

Xu G., Wu S.-F., Gu G.-X., Teng Z.-W., Ye G.-Y. a Huang J. (2017): Pharmacological characterization of dopamine receptors in the rice striped stem borer, *Chilo suppressalis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **83**, 80-93 (DOI: 10.1016/j.ibmb.2017.03.004).

Zestos A.G. a Kennedy R.T. (2017): Microdialysis Coupled with LC-MS/MS for *In Vivo* Neurochemical Monitoring. *The AAPS Journal* **19**, 1284-1293 (DOI: 10.1208/s12248-017-0114-4).

Zhang W., Wang X., Yang S., Niu Q., Wu L., Li Y. a Zhou J. (2020): Simultaneous quantification of five biogenic amines based on LC–MS/MS and its application in honeybee venom from different subspecies. *Biomedical Chromatography* **34**, e4740 (DOI: 10.1002/bmc.4740).

Zheng Y., Hirschberg B., Yuan J., Wang A.P., Hunt D.C., Ludmerer S.W., Schmatz D.M. a Cully D.F. (2002): Identification of Two Novel *Drosophila melanogaster* Histamine-gated Chloride Channel Subunits Expressed in the Eye. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 2000-2005 (DOI: 10.1074/jbc.M107635200).

10 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

$\times g$	násobek gravitačního přetížení (používán při centrifugaci)
µl	mikrolitr (jednotka objemu)
µm	mikrometr (jednotka délky)
µmol.dm^{-3}	mikromol na decimetr krychlový (jednotka molární koncentrace); značeno také µM
5-HT	5-hydroxytryptamin (znám také pod názvem serotonin)
6,7-ADTN	6-amino-5,6,7,8-tetrahydronaftalen-2,3-diolhydrobromid
9-ODA	kyselina 9-oxo-decenová
AADC	dekarboxylasa aromatických aminokyselin
AANAT	arylalkylamin *N*-acetyltransferasa
AC	adenylátcyklasa
AcN	acetonitril
AMK	aminokyselina
ATP	adenosintrifosfát
BA/s	biogenní amin/y
BASi®	společnost BioAnalytical Systems
bbCID	širokospektrá disociace iontů indukovaná jejich kolizí („broadband collision-induced dissociation“)
BzCl	benzoylchlorid
Bz-Dopamin	benzoylovaný dopamin
Bz-Histamin	benzoylovaný histamin
Bz-Oktopamin	benzoylovaný oktopamin
C	cystein
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát

CLP	„cross-linked product“ (zesíťovaný produkt degradace dopaminu vedoucí ke sklerotizaci kutikuly)
CNS	centrální nervový systém
D	aspartát
D_1	první skupina dopaminových receptorů u obratlovců
D_2	druhá skupina dopaminových receptorů u obratlovců
D_3	třetí skupina dopaminových receptorů u obratlovců
D_4	čtvrtá skupina dopaminových receptorů u obratlovců
D_5	pátá skupina dopaminových receptorů u obratlovců
DAG	diacylglycerol
DANADB	2-(3′, 4′-dihydroxyfenyl)-3-acetylamino-6-(N-acetyl-2′-aminoethyl)-2,3-dihydro-1,4-benzodioxin (produkt degradace dopaminu vedoucí ke sklerotizaci kutikuly)
DAO	diamin oxidasa
*Dm*HCLCA	histamine-gated chloride channel A (ionotropní receptor propouštějící chloridové anionty typu A) u druhu *Drosophila melanogaster*
*Dm*HCLCB	histamine-gated chloride channel B (ionotropní receptor propouštějící chloridové anionty typu B) u druhu *Drosophila melanogaster*
Dop/Ecd	čtvrtá skupina dopaminových receptorů u hmyzu
Dop1	první skupina dopaminových receptorů u bezobratlých
Dop2	druhá skupina dopaminových receptorů u bezobratlých
Dop3	třetí skupina dopaminových receptorů u bezobratlých
DUM neurony	„dorsal unpaired median“ (klastr dorsálních bilaterálně symetrických neuronů nacházejících se v centrální nervové soustavě hmyzu)

E	kyselina glutamová
ECD	elektrochemická detekce
ER	endoplazmatické retikulum
ES	extracelulární smyčka
ESI	ionizace elektrosprejem („electrospray ionization“)
EtOH	ethanol
F	fenylalanin
FA	kyselina mravenčí („formic acid“)
FAH	fenylalanin-4-monooxygenasa
$g.mol^{-1}$	gram na mol (jednotka molekulové hmotnosti sloučenin)
GABA	kyselina γ-aminomáselná
G_i	inhibiční G-protein (zprostředkovávající inhibici AC)
GPCR	G-protein-coupled receptor (receptor spřažený s G-proteinem)
G_q	třída G-proteinů zprostředkovávající aktivaci PLC
G_s	stimulující G-protein (zprostředkovávající aktivaci AC)
$G_{\alpha i}$	α podjednotka inhibičního G_i-proteinu
$G_{\alpha q}$	α podjednotka G_q-proteinu
$G_{\alpha s}$	α podjednotka G_s-proteinu
H_1	první skupina histaminových receptorů u obratlovců
H_2	druhá skupina histaminových receptorů u obratlovců
H_3	třetí skupina histaminových receptorů u obratlovců
HCl	kyselina chlorovodíková
HCLC	histamine-gated chloride channel (ionotropní receptor propouštějící chloridové anionty)
$HClO_4$	kyselina chloristá

HD	histidin dekarboxylasa
HESI	ionizace elektrosprejem s vyhříváním vaporizéru („heated electrospray ionization“)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie („high-performance liquid chromatography“)
HPLC-ECD	metoda využívající kombinaci separační metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie spojené s elektrochemickou detekcí
HPLC-MS	metoda využívající kombinaci separační metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie spojené s detekcí pomocí hmotnostní spektrometrie
HPLC-MS/MS	metoda využívající kombinaci separační metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie spojené s detekcí pomocí hybridní (či tandemové) hmotnostní spektrometrie
HPLC-UV	metoda využívající kombinaci separační metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie spojené s detekcí v UV oblasti světelného záření
HVA	homovanillylalkohol
IEC	iontoměničová chromatografie („ion-exchange chromatography“)
IP_3	inositol 1,4,5-trisfosfát
IP_3R	receptor IP_3
IS	intracelulární smyčka
IS*	interní standard/interní standardy
IsoP	isopropanol
kPa	kilopascal (jednotka tlaku)
LC-MS	kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií („liquid chromatography mass spectrometry“)
L-DOPA	L-3,4-dihydroxyfenylalanin

LLE	extrakce kapaliny kapalinou („liquid-liquid extraction“)
m/z	hodnota v hmotnostní spektrometrii udávající poměr hmotnosti iontu udávaného v atomových hmotnostních jednotkách a jeho formálního náboje
MAPK	mitogen-activated proteinkinase (mitogenem aktivovaná proteinkinasa)
MeOH	methanol
MF	mobilní fáze
$mg.dm^{-3}$	miligram na decimetr krychlový (jednotka hmotnostní koncentrace)
$mmol.dm^{-3}$	milimol na decimetr krychlový (jednotka molární koncentrace); značeno také mM
$mol.dm^{-3}$	mol na decimetr krychlový (základní jednotka molární koncentrace); značeno také M
MS	hmotnostní spektrometrie („mass spectrometry“)
MS/MS	hybridní (či tandemová) hmotnostní spektrometrie
NADA	N-acetyldopamin
NBAD	N-β-alanyldopamin
nmol	nanomol (jednotka látkového množství)
$nmol.dm^{-3}$	nanomol na decimetr krychlový (jednotka molární koncentrace); značeno také nM
OctαR	rodina α-receptorů oktopaminu podobných adrenergním
OctβR	rodina β-receptorů oktopaminu podobných adrenergním
OPA	*o*-ftalaldehyd
PAM neurony	„protocerebral anterior medial“ (klastr neuronů nacházející se ve tkáni *corpora pedunculata* u zástupců hmyzu
PKA	proteinkinasa A

PKC	proteinkinasa C
PLC	fosfolipasa C
PM	plazmatická membrána
pmol	pikomol (jednotka látkového množství)
$pmol.dm^{-3}$	pikomol na decimetr krychlový (jednotka molární koncentrace); značeno také pM
PO3	fenoloxidasa 3
PPL1 neurony	„protocerebral posterior lateral 1“ (klastr neuronů nacházející se ve tkáni *corpora pedunculata* u zástupců hmyzu
PQ	paraquat
*Px*HCLCA	histamine-gated chloride channel A (ionotropní receptor propouštějící chloridové anionty typu A) u druhu *Papilio xuthus*
*Px*HCLCB	histamine-gated chloride channel B (ionotropní receptor propouštějící chloridové anionty typu B) u druhu *Papilio xuthus*
Q	kvadrupólový analyzátor
QMP	matčin (královnin) mandibulární feromon
QqQ	trojitý kvadrupólový analyzátor
Q-TOF	analyzátor vzniklý spojením kvadrupólového analyzátoru a „time-of-flight“ analyzátoru
Q-TRAP	analyzátor vzniklý spojením kvadrupólového analyzátoru a iontové pasti
RLR	rhodopsin-like receptor (receptor podobný rhodopsinu)
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie v reverzní fázi („reversed-phase high-performance liquid chromatography“)
RP-LC	kapalinová chromatografie v reverzní fázi („reversed-phase liquid chromatography“)
RT	retenční čas/retenční časy

S	serin
s^{-1}	sekunda na $^{-1}$ (jednotka frekvence)
SD	směrodatná odchylka/směrodatné odchylky
SF	stacionární fáze
SCH-23390	7-chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-fenyl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3-benzazepin
SPE	extrakce na pevnou fázi („solid phase extraction“)
STD	standard/standardy
T	threonin
TBH	tyramin β-hydroxylasa
TD	tyrosin dekarboxylasa
TFA	kyselina trifluoroctová („trifluoroacetic acid“)
TH	tyrosin-3-monooxygenasa
TOF	„time-of-flight“ analyzátor
TPH	tryptofan 5-monooxygenasa
TRAP	analyzátor typu iontová past
TRV	vialky redukující residuální ztráty analytu o téměř 100 %
TT	trávicí trakt
TyrR	rodina receptorů specifických pro oktopamin a tyramin, či čistě pro tyramin
v/v	objemová procenta připravovaného roztoku určité látky vztáhnutá na celkový objem vzorku
w/w	hmotnostní procenta určité látky vztáhnutá na celkovou hmotnost vzorku