

Bio

Ročník 30 • Číslo 2/2020

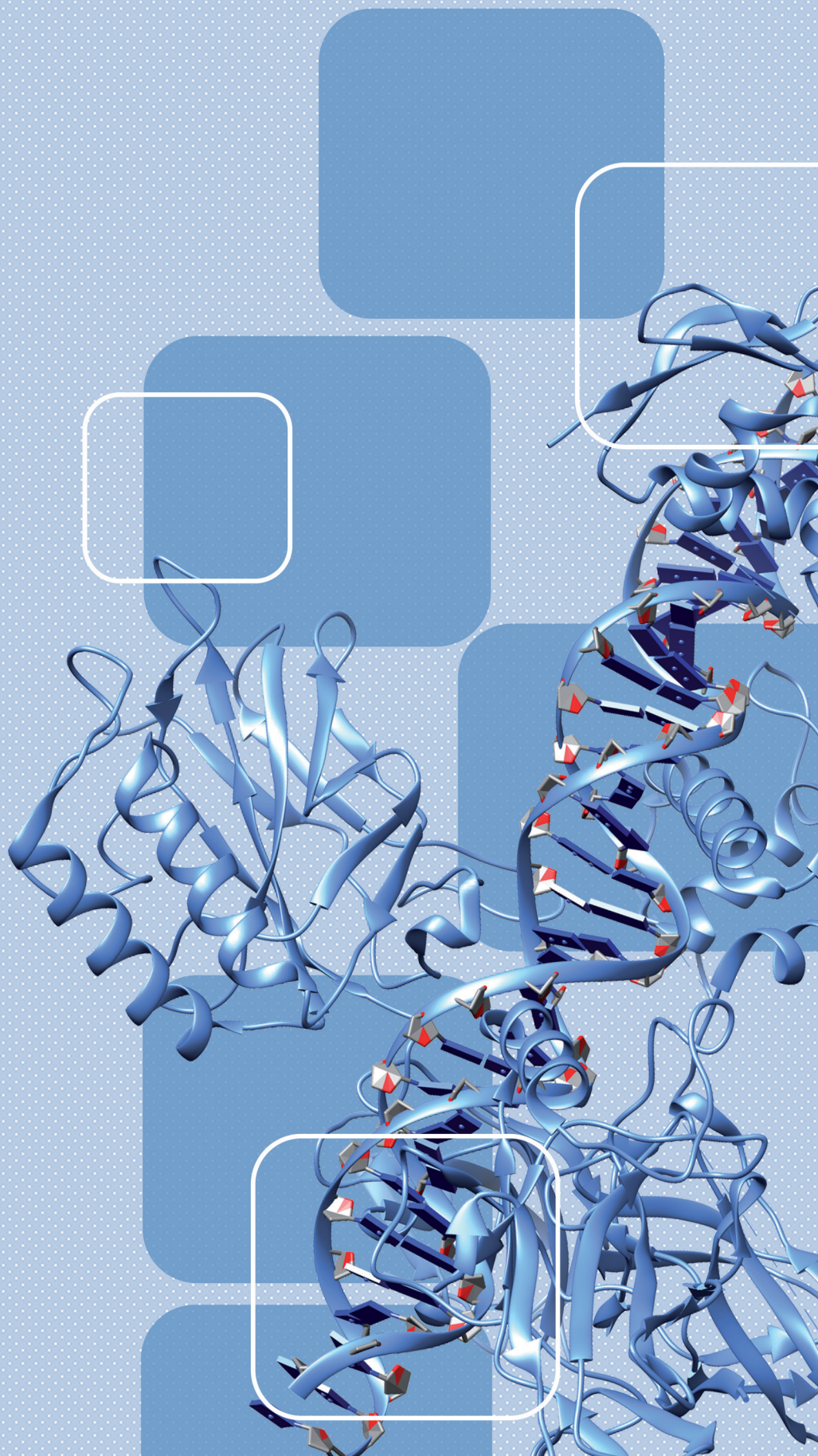
prospect

**BULLETIN
BIOTECHNOLOGICKÉ
SPOLEČNOSTI**

zakládajícího člena
Českého svazu
vědeckotechnických
společností (ČSVTS)

a

člena „European
Federation
of Biotechnology“
(EFB)



Bio prospect

Society address: University of Chemistry and Technology, Technická 3, 166 28 Prague 6, Czech Republic.
Tel.: 420-220 443 151, fax: 420-233 334 769, e-mail: danka.pokorna@vscht.cz, IČO 00570397,
account No.: 19534-061/0100 Komerční banka Praha 6, Dejvická 52, SWIFT CODE: COMBCZTPP

Czech Republic Regional Branch Office as a bridge between European Federation of Biotechnology and Czech Biotechnology Society is located in the Centre of the Region Hana for Biotechnological and Agricultural Research, Šlechtitelů 21, 783 71 Olomouc, Czech Republic

BULLETIN OF CZECH BIOTECHNOLOGY SOCIETY

**founding member of the Czech Association of Scientific
and Technical Societies – <http://en.csvts.cz>**

**and
member of European Federation of Biotechnology
<http://www.efbiotechnology.org>**

Bioprospect, the bulletin of the Biotechnology Society is a journal intended to inform the society members about the most recent developments in this field. The bulletin should supply the vitally important knowledge directly to those who need it and to those who are able to use it properly. In accordance with the rules of the Society, the Bulletin also deals with both theoretical and practical questions of biotechnology. Articles will be published informing about the newest theoretical findings, but many planned papers are devoted to fully practical topics. In Czech Republic there is a growing gap between basic research and production. It is extremely important to reverse as soon as possible the process of further opening of the scissors, and we hope the Bulletin will help in this struggle by promoting both research and practice in our biotechnology. The Bulletin should facilitate the exchange and targeted delivery of information. The editorial board welcome advertisements of products such as chemicals, diagnostics, equipment and apparatus, which have already appeared

on the Czech market, or are projected, enter it. Services, free R&D or production facilities can also be advertised. The editorial board, together with the executive committee of the Biotechnology Society, hope that maybe some information published in the Bulletin, or some new contacts based on it, will give birth to new cooperation with domestic or foreign research teams, to collaborations, joint ventures or strategic alliances providing access to expertise and financing in international markets.

The editorial board invites all of You, who are involved in the field called biotechnology, and who are seeking contacts in Czech Republic, to advertise in the Bulletin BIOPROSPECT, which is mailed directly to more than one and a half thousand Czech biotechnologists.

For more information contacts the editorial board or directly:

Petra Lipovová, Ph.D. (editor in chief)
UCT, Technická 3
166 10 Prague 6, Czech Republic
Phone +420 220 443 028
e-mail: petra.lipovova@vscht.cz

ÚVODEM

Vážení přátelé,

přinášíme Vám druhé číslo již 30. ročníku našeho Bioprospectu, tentokrát za velmi nestandardních podmínek, kdy coronavirová pandemie prakticky rozvrátila náš obvyklý způsob života. Opatření zaměřená k jejímu zastavení nás donutila k omezení nebo dokonce k zastavení mnoha běžných činností, jejichž důsledkem bylo nejen zpoždění v realizaci mnoha obvyklých aktivit, ale především ohromné ekonomické ztráty, jejichž důsledky nás budou ovlivňovat řadu příštích let. Musíme jen doufat, že „druhá vlna coronavirové pandemie“ se neuskuteční a k dalším problémům už nedojde.

Vzhledem k nemožnosti shromažďování a mezistátního cestování jsme museli odložit konání našeho biotechnologického symposia „Biotech 2020“. Po podrobném zvážení všech okolností jsme se rozhodli symposium odložit přesně o rok, t.j. na 16 – 19. 6. 2021 pod stejným názvem BIOTECH 2020 a se stejnou webovou stránkou www.biotech2020.cz. Rádi bychom poděkovali všem přihlášeným účastníkům, sponzorům a podporovatelům i vedení VŠCHT v Praze za laskavé pochopení a podporu. Na zmíněné webové stránce jsme publikovali již předběžný program, který je upraven tak, aby byl k dispozici prostor pro další účastníky, které velice rádi uvítáme. Až do konce února 2021 je možné se přihlásit za snížený registrační poplatek (early bird) a rádi prodiskutujeme se zájemci návrhy na jakoukoliv formu spolupráce, včetně organizace různých setkání a workshopů.

Vzhledem k tomu, že nám již půl roku značně komplikuje život malý virus a trápení stále ještě není konec, připomeňme si několik základních informací o koronavirech. Koronaviry (CoV) jsou jednořetězcové RNA viry, které snadno mutují a napadají hostitele – různé ptáky a také savce. Způsobují obvykle respirační potíže a méně často gastrointestinální a neurologické problémy.

Koronaviry byly poprvé prokázány u kuřat v r. 1930 a dlouho se myslelo, že napadají jen ptáky. Poprvé byl koronavirus identifikován u lidí až v r. 1960. Ukázalo se, že koronaviry jsou rozšířené po celém světě a podílejí

se zhruba na 10 – 15 % běžných nachlazení, většinou v průběhu zimy. Na nachlazeních se někdy podílely společně s bakteriemi a takové „ko-infekce“ měly vážnější charakter.

Koronaviry mající fatální následky se objevily teprve nedávno. V r. 2002 byl detegován kmen označovaný jako **SARS-CoV** či prostě Sars (severe acute respiratory syndrome). V následujícím roce Canada's National Microbiology Laboratory stanovila jeho genom. Tento smrtící kmen údajně způsobil smrt 774 lidem. Sars se značně podobá současnému pandemickému COVID-19.

Zhruba po 10 letech (v r. 2012) byl v Saudské Arabii identifikován koronavirus **MERS-CoV** (Middle East respiratory syndrom = Mers). Mers se kromě opakovaného výskytu v Saudské Arabii vyskytoval i v Jižní Koreji (2015).

V průběhu let byly prokázány další lidské koronaviry, které nebyly spojeny s větší úmrtností a žádné z nich, včetně SARS-CoV a MERS-CoV nevyvolaly pandemii. Tu vyvolal až COVID-19 (SARS-CoV-2) vzhledem k širšímu spektru možností přenosu. V současnosti byly zasaženy všechny státy světa kromě Severní Koreje, Turkmenistanu a Lesotha, ale věrme tomu.

Příznivou zprávou je, že ve většině případů bývá průběh nemoci mírný a současná medicína má řadu možností jednotlivé průvodní jevy onemocnění omezit. Finálním řešením by měla být očkovací vakcína, pokud mezitím virus nezmuteje.

Vážení a milí čtenáři Bioprospectu, přejeme Vám, abyste všechny dosavadní problémy překonali, prožili příjemnou zaslouženou dovolenou a na podzim jste již mohli působit standardním způsobem, jak jste zvyklí. Pokud budete mít čas a chuť, napište nám, co byste chtěli v rámci naší společnosti zlepšit. Na podzim uskuetečné nové volby do Rady Biotechnologické společnosti a rádi uvítáme mladé tváře, které by společnosti daly nové podněty pro její další práci.

Se srdečnými pozdravy

Vaši

Jan Káš a Petra Lipovová

Informace o COVID-19:

<https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/febs.15375>

STUDIUM MITOCHONDRIÍ ŽIVÝCH BUNĚK POMOCÍ 3D SUPER-ROZLIŠOVACÍ SVĚTELNÉ MIKROSKOPIE

Anežka Vodičková

Fyziologický ústav AV ČR; anezka.kahancova@fgu.cas.cz

Úvod

Super-rozlišovací mikroskopie se během posledních let stala nedílnou součástí vědeckého světa. Její schopnost překročit, přesněji řečeno obejít, Abbého difrakční limit pomáhá získávat nové informace o fungování a struktuře organismů. Kromě super-rozlišení, je obrovským benefitem těchto metod možnost zkoumat nejen fixované, ale i živé buňky, což kromě možnosti snímat *in vivo* dynamické buněčné procesy v reálném čase přináší i možnost vyhnout se artefaktům, které mohou být způsobeny fixováním a přípravou vzorku.

Mitochondrie, buněčné elektrárny eukaryot, se neustále těší širokému vědeckému zájmu. Tyto velmi dynamické organely prozradí mnohé o svém fyziologickém stavu skrze morfologické změny v tubulární síti, ve které jsou obvykle organizovány. Obecně je průměr mitochondriálních tubulů obdobný jako rozlišovací limit konfokální mikroskopie (250–500 nm)^{1, 2, 3}. Z toho je zřejmé, že pro podrobné zkoumání architektury mitochondrií je zapotřebí použití mikroskopie super-rozlišovací.

Strategie super-rozlišovací mikroskopie

Super-rozlišovací světelná mikroskopie je schopna překonat Abbého difrakční limit, který má hodnotu mezi 200–250 nm, čehož dosahuje různými přístupy. Obejití tohoto omezení je postaveno na třech základních principech. Jedná se o strukturní iluminační mikroskopii (mikroskopii se strukturním osvětlením), lokalizační mikroskopii a mikroskopii využívající stimulované potlačení emise.

Strukturní iluminační mikroskopie

Strukturní iluminační mikroskopie (SIM, z angl. Structured Illumination Microscopy) bývá označovaná jako vysoce-rozlišovací (z angl. high-resolution), protože obvyklé rozlišení v osách xy dosahuje přibližně 150 nm a v ose z 400 nm. Tato metoda používá excitační světlo ve formě mřížky, kterým osvětluje vzorek pod třemi různými úhly s pěti lineárními posunutími. Výsledná data jsou matematicky rekonstruována pomocí Fourierovy transformace obrazu^{4, 5, 6}.

Mikroskopie využívající stimulované potlačení emise

Mikroskopická metoda STED (z angl. STimulated Emission Depletion – stimulované potlačení emise) dosahuje standardně rozlišení pod 50 nm v osách xy a 150 nm v ose z. Tato metoda je variantou skenovací konfokální mikroskopie, u které je navíc použit laserový paprsek, jenž směřuje do stejného místa jako excitační laserový paprsek. Tento přidáný paprsek (depleční

laser) má prstencový profil intenzity a tvoří tak „donut“ s nízkou (prakticky nulovou) intenzitou uprostřed. Fluorescenční molekuly vyskytující se v oblasti ozářené deplečním laserem jsou donuceny navrátit se do základního stavu. Rozlišení potom závisí na velikosti oblasti, ve které nedochází k depleci emise. Ta je omezená intenzitou deplečního laseru, která je obecně u biologických vzorků limitována jejich možným poškozením^{7, 8, 9}.

Lokalizační mikroskopie

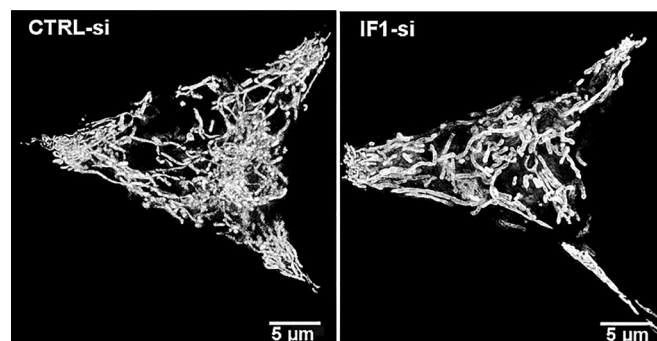
Metody STORM¹⁰ (z angl. STochastic Optical Reconstruction Microscopy), PALM¹¹ (PhotoActivation Localization Microscopy) a FPALM¹² (Fluorescence Photo-Activation Localization Microscopy) využívají stejný princip a byly objeveny a zveřejněny krátce po sobě v roce 2006. Tyto metody používají fluorofory se dvěma různými stavy, jeden vyzařuje fluorescenci, druhý nikoliv. Tyto stavy lze měnit použitím světla o různých vlnových délkách nebo je lze měnit stochasticky. Záření emituje vždy jen náhodný a malý počet molekul, jejichž fluorescence je snímána a zaznamenána. Četným opakováním se získá dostatek dat, aby bylo možné každému fotonu s použitím rozptylové funkce (PSF, z angl. point spread function) matematicky přiřadit souřadnice¹³. Rozlišení, kterého lze dosáhnout, je 30 nm v laterální rovině a přibližně 40–60 nm v ose z^{14, 15, 16}.

Super-rozlišovací mikroskopie živých buněk

Všechny tyto tři přístupy mohou být aplikovány i na snímání živých vzorků a lze skrze ně získat fascinující obrazy vnitrobuněčných struktur. Největší výzvou posledních let je optimalizace výkonu každé techniky tak, aby stejná data získaná běžně na neživých (fixovaných) vzorcích mohla být rutinně snímána právě i s použitím živých buněk. Mezi hlavní řešené problémy patří zejména fototoxicita a rychlost snímání. Nižší vlnová délka excitačního světla obecně zlepšuje rozlišení obrazu, leč světlo s kratšími vlnovými délkami, než ultrafialové je pro buňky toxické.

Strukturní iluminační mikroskopie je nejsnadněji použitelná pro zobrazování živých vzorků, protože vyžaduje nízký počet (obvykle 15) snímků k rekonstrukci super-rezolučního obrazu. Omezení této metody přináší výrazné snížení intenzity snímaného signálu v čase (zesvětlení, z angl. photobleaching), a/nebo příliš rychlý pohyb ve vzorku během získávání obrazu. Jsou-li zobrazované procesy rychlé, vyžaduje jejich zobrazení velmi krátkou expozici a vysoký výkon laseru, což může způsobit poškození buněk. Touto super-rozlišovací technikou je možné získat data pro jeden obraz v čase mezi několika sekundami až po deseti sekund v závislosti

na konstrukci mikroskopu^{17, 18}. Vzhledem k rychlému snímání obrazu, velkému zobrazovacímu poli a skutečnosti, že můžeme použít libovolný fluorofor, je SIM častou volbou pro zobrazování živých buněk (Obr. 1).



Obr. 1: Změny v morfologii mitochondriálních sítí živých INS-1E buněk způsobené redukcí exprese mitochondriálního proteinu inhibičního faktoru 1 (IF1) pomocí transientního umlčení genu kódujícího IF1. Mitochondrie byly označeny pomocí MitoView Dye a zobrazeny strukturní iluminací mikroskopii (SIM). Vlevo jsou kontrolní INS-1E buňky (CTRL-si), vpravo INS-1E buňky (IF1-si) s umlčeným genem kódující regulátor ATP synthasy IF1, jejichž mitochondriální síť je více fragmentovaná a jednotlivě tubuly širší.

Rozlišení **mikroskopie využívající stimulované potlačení emise** nemá žádné teoretické omezení. Závisí na intenzitě deplečního i excitačního laseru. Je jasné, že v živém vzorku jsou intenzity limitovány možným poškozením vzorku. U zobrazování živých buněk touto metodou hledáme kompromis mezi rozlišením, rychlostí snímání a oblastí, kterou lze zobrazit, protože se jedná o skenovací techniku, a rychlost je tedy nepřímo úměrná ploše. Pro zjišťování kolokalizace proteinů v biologických vzorcích je nesmírně důležité mít možnost pořizovat snímky ve dvou různých kanálech. K tomu jsou zapotřebí dvě standardní barviva, ke kterým jsou vyžadovány dva excitační paprsky, a dva depleční lasery, avšak sladit takovýto systém je velmi náročné¹⁹. Alternativním přístupem je použití standardního barviva a k tomu druhého barviva s velkým rozdílem mezi absorpční a emisní vlnovou délkou, takže stejný depleční laser lze použít pro obě barviva²⁰.

Hlavním omezením **lokalizační mikroskopie** při zobrazování živých buněk je rychlost snímání obrazu. Doba získání dostatečného množství snímků (desetitisíce) je obvykle nejméně několik minut, ale mnoho procesů v buňkách se odehrává v mnohem kratším časovém intervalu. V posledních letech však bylo zřejmého několik dílčích zlepšení, které slibují jednodušší zobrazování dynamických změn v živých buňkách, a to především v těchto oblastech: jasnější fluorofory, které způsobí, že buňka je osvětlována kratší dobu, leč zaznamenaný počet fotonů je stejný; dále budování mikroskopů s rychlým, samočinně nastavitelným ovládáním laserů, které umožní přepínání a buzení fluoroforů ve velmi krátkých časových intervalech; a vývoj metod analýzy, díky čemuž bude třeba získat méně dat^{21, 22}.

3D super-rozlišovací mikroskopie

Je dáno optickou konstrukcí fluorescenčního mikroskopu, že laterální rozlišení (rovina xy) je výrazně lepší ve srovnání s axiálním rozlišením (osa z). Tato diskrepance je způsobena pozorováním vzorku pouze z jednoho směru, a to pomocí mikroskopické čočky. Zčásti lze tento problém vyřešit použitím skenovacího konfokálního mikroskopu se sekvenčním zobrazováním v různých ohniskových rovinách s následnou korekcí trojrozměrného obrazu.

Nejběžnějším způsobem stanovení souřadnic molekuly v ose z v **lokalizační mikroskopii** je použití astigmatismu, tj. předvídatelné deformace tvaru rozptylové funkce (PSF), která vznikne po vložení speciální válcové čočky před kameru mikroskopu. Stupeň deformace se snadno zohlední během rekonstrukce obrazu²³.

Při hledání všeobecného přístupu, který by sloužil k zobrazení celé buňky v ose z, byl navržen nový způsob, který využívá tzv. světelné listy (z angl. light sheet). Nejjednodušší variantou je režim HILO (z angl. Highly Inclined and Laminated Optical Sheet). V tomto případě se excitační světlo šíří vzorkem jako tenká vrstva o tloušťce několika mikrometrů, která je relativně nakloněna k ohniskové rovině. Toto nastavení výrazně snižuje signál pozadí. Zorné pole dostupné při skenování v režimu HILO je však velmi úzké a zobrazení tak malého předmětu, jako jsou jednotlivé buňky, je obtížné. Nejslibnějším přístupem je použití tzv. Besselových paprsků vytvořených pomocí speciálně zakřivených čoček. Tato metoda byla pojmenována LLSM (z angl. Lattice Light-Sheet Microscopy)²⁴. Kombinace LLSM a **strukturované iluminací mikroskopie** pomocí fluorescenčních proteinů umožňuje dosáhnout izotropního rozlišení asi 100 nm v živých buňkách²⁵. Kombinace LLSM a **mikroskopie využívající stimulované potlačení emise** může zlepšit axiální rozlišení mikroskopu^{26, 27, 28}.

Mitochondrie v nanosvětě

Mitochondrie jsou dvoumembránové, semiautonomní organely pravděpodobně prokaryotického původu. Mitochondrie se ve většině buněk vyskytují jako podlouhlá, dynamická, vnitřně propojená tubulární síť, která komunikuje s ostatními kompartmenty buňky. Mitochondriální síť je schopna změnit tvar, velikost, počet či polohu během několika sekund. K tomu jí pomáhá především proces dělení (štěpení), kdy se jeden mitochondriální tubul rozdělí na dva či více fragmentů, a proces fúze, což je opačná akce. Tento proces vyžaduje nejvyšší možnou koordinaci, je nutné rozdělit či spojit obě mitochondriální membrány, aniž by došlo k závažné ztrátě obsahu matrix a mezimembránového prostoru mitochondrie. Hlavní úlohou fúze a štěpení mitochondriální sítě je sdílení obsahu, když je část mitochondrií poškozena nebo ztratila některé své segmenty^{29, 30, 31}. Vnější membrána mitochondrií je porézní a propustná, vnitřní je nepropustná pro protony a rozdělena vchlípeninami, které se nazývají kristy, a její fosfolipidové složení se liší od membrány vnější. Uspořádání a morfologie krist nejsou náhodné, naopak

jejich tvar a počet odpovídá energetickému stavu a požadavkům buňky.

Vzhledem k tomu, že super-rozlišovací techniky při studiu mitochondrií musí být schopné zodpovídat různorodé otázky, je zřejmé, že jediná metoda nemůže univerzálně sloužit všem účelům. Výběr zobrazovací metody bude záviset především na požadované rychlosti snímání, typu vzorku a preferovaném způsobu značení^{32, 33, 34}. Díky svému axiálnímu rozlišení ve studiích o mitochondriální architektuře živých buněk vyniká mikroskopie STED. Zobrazení živých HeLa buněk, které exprimovaly fúzní protein SNAP-tag značící křisty³⁵, pomocí mikroskopie STED, dosahovalo rozlišení až 50 nm v ose xy, avšak s malým zorným polem. Velké zorné pole zajišťuje použití metody SIM. Jako například při zobrazení buněk COS-7 značených pomocí MitoTracker Green³⁶ nebo MCC13 buněk exprimujících marker vnější membrány mEmerald-TOM20³⁷. Ačkoli k zobrazování pomocí lokalizační mikroskopie se většinou používají fixované buňky, nedávno byly publikovány³⁸ časosběrné snímky STORM buněk BS-C-1 značených MitoTracker Red, který značí vnitřní mitochond-

riální membránu. Při zobrazování mitochondrií v živých buňkách je třeba mít na zřeteli jejich vysokou citlivost na jakýkoli diskomfort (zobrazovací medium, teplota atp.), který se okamžitě projevuje morfologickými změnami (přílišným štěpením). Obdobně může značení proteinem a/nebo jeho nadměrná exprese interferovat s mitochondriální funkcí či architekturou, proto jsou nezbytné kontrolní experimenty^{39, 40}.

Závěr

Není pochyb, že super-rozlišovací mikroskopie bude čím dál častěji využívána právě pro svou schopnost zobrazovat žádané struktury s výborným rozlišením v desítkách nanometrů nejen ve fixovaných, ale i v živých buňkách. To elektronová mikroskopie, která dosahuje ještě lepších rozlišení, nedokáže. Se stále se zlepšujícím rozlišením stále dostupnějších super-rozlišovacích mikroskopů je očekávatelné, že bude stále snazší zkoumat rychlé, dynamické buněčné procesy, a bude tak velmi jednoduché získat naprosto nový vhled do struktury a fungování organismů.

Literatura

1. Kaasik A, Safiulina D, et al.: *Am J Physiol Cell Physiol* 292(1), C157 (2007).
2. Egner A, Jakobs S, et al.: *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(6), 3370 (2002).
3. Jakobs S, Stoldt S, et al.: *Adv Biochem Eng Biotechnol* 124(1) (2011).
4. Gustafsson MG: *J Microsc* 198(Pt 2), 82 (2000).
5. Gustafsson MG, Shao L, et al.: *Biophys J* 94(12), 4957 (2008).
6. Heintzmann R: *Micron* 34(6-7), 283 (2003).
7. Hell SW and Wichmann J: *Opt Lett* 19(11), 780 (1994).
8. Willig KI, Harke B, et al.: *Nat Methods* 4(11), 915 (2007).
9. Cox S: *Dev Biol* 401(1), 175 (2015).
10. Rust MJ, Bates M, et al.: *Nat Methods* 3(10), 793 (2006).
11. Betzig E, Patterson GH, et al.: *Science* 313(5793), 1642 (2006).
12. Hess ST, Girirajan TP, et al.: *Biophys J* 91(11), 4258 (2006).
13. Pertsinidis A, Zhang Y, et al.: *Nature* 466(7306), 647 (2010).
14. Juetten MF, Gould TJ, et al.: *Nat Methods* 5(6), 527 (2008).
15. Jia S, Vaughan JC, et al.: *Nat Photonics* 8(302) (2014).
16. Von Diezmann A, Shechtman Y, et al.: *Chem Rev* 117(11), 7244 (2017).
17. Hirvonen LM, Wicker K, et al.: *Eur Biophys J* 38(6), 807 (2009).
18. Kner P, Chhun BB, et al.: *Nat Methods* 6(5), 339 (2009).
19. Rankin BR, Moneron G, et al.: *Biophys J* 100(12), L63 (2011).
20. Pellett PA, Sun X, et al.: *Biomed Opt Express* 2(8), 2364 (2011).
21. Huang F, Hartwich TM, et al.: *Nat Methods* 10(7), 653 (2013).
22. Jones SA, Shim SH, et al.: *Nat Methods* 8(6), 499 (2011).
23. Huang B, Wang W, et al.: *Science* 319(5864), 810 (2008).
24. Chen BC, Legant WR, et al.: *Science* 346(6208), 1257998 (2014).
25. Li D, Shao L, et al.: *Science* 349(6251), aab3500 (2015).
26. Yu W, Ji Z, et al.: *Laser & Photonics Reviews* 10(1), 147 (2016).
27. Friedrich M, Gan Q, et al.: *Biophys J* 100(8), L43 (2011).
28. Gohn-Kreuz C and Rohrbach A: *Opt Express* 24(6), 5855 (2016).
29. Legros F, Lombes A, et al.: *Mol Biol Cell* 13(12), 4343 (2002).
30. Pernas L and Scorrano L: *Annu Rev Physiol* 78(505) (2016).
31. Suen DF, Norris KL, et al.: *Genes Dev* 22(12), 1577 (2008).
32. Sahl SJ, Hell SW, et al.: *Nat Rev Mol Cell Biol* 18(11), 685 (2017).
33. Schermelleh L, Ferrand A, et al.: *Nat Cell Biol* 21(1), 72 (2019).
34. Vangindertael J, Camacho R, et al.: *Methods Appl Fluoresc* 6(2), 022003 (2018).
35. Stephan T, Roesch A, et al.: *Sci Rep* 9(1), 12419 (2019).
36. Huang X, Fan J, et al.: *Nat Biotechnol* 36(5), 451 (2018).
37. Opstad IS, Popova DA, et al.: *Biomed Opt Express* 9(12), 5939 (2018).
38. Shim SH, Xia C, et al.: *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(35), 13978 (2012).
39. Gibson TJ, Seiler M, et al.: *Nat Methods* 10(8), 715 (2013).
40. Ratz M, Testa I, et al.: *Sci Rep* 5(9592) (2015).

Souhrn

Vodičková A.: Studium mitochondrií živých buněk pomocí 3D super-rozlišovací světelné mikroskopie

Super-rozlišovací mikroskopie je schopna různými způsoby obejít difrakční limit a dosahovat izotropického rozlišení desítek nanometrů. V současné době se vyvíjí značné úsilí, aby stejná kvalita výsledků, které lze získat s fixovanými vzorky, byla dosažitelná i s buňkami živými. Vzhledem k četnosti dynamických vnitrobuněčných procesů je žádoucí, aby super-rozlišovací 3D mikroskopie byla co nejdříve běžným a dostupným způsobem, jak tyto procesy pozorovat a zkoumat. Mitochondrie, semiautonomní buněčné elektrárny, skrývají stále spoustu nezodpovězených otázek, na které by v budoucnu právě 3D super-rozlišovací mikroskopie živých buněk mohla nalézt odpovědi.

Klíčová slova: Super-rozlišovací mikroskopie, živé buňky, mitochondrie

Summary

Vodičková A.: Study of mitochondria in living cells using 3D super-resolution light microscopy

Super-resolution microscopy can variously circumvent the Abbe's diffraction limit and achieve an isotropic resolution of tens of nanometers. Considerable efforts are currently being made to ensure that the same quality of results that can be obtained using fixed samples are achievable using living cells. Since the numerous intracellular dynamic processes occur in cells, it is desirable to make super-resolution 3D microscopy an available method as soon as possible in order to investigate these processes. Mitochondria, semi-autonomous cellular power-plants, still hide a lot of unanswered questions, to which specifically 3D super-resolution microscopy of living cells could find answers in the future.

Keywords: super-resolution microscopy, live-cell, mitochondria

MIKROORGANISMY KONTAMINUJÍCÍ AUDIOVIZUÁLNÍ A FOTOGRAFICKÉ PAMÁTKY KULTURNÍHO DĚDICTVÍ: IZOLACE A IDENTIFIKACE

Tereza Branyšová, Kateřina Demnerová, Hana Stiborová

Ústav biochemie a mikrobiologie, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze; branyso@vscht.cz

Úvod

Pro zachování historických kinematografických materiálů a fotografií pro další generace, je nutné v archívech zajistit vhodné skladovací podmínky¹. Biodegradace neboli jakákoli nežádoucí změna (tvorba skvrn, změny struktury) uchovávaných sbírkových předmětů je způsobená činností mikroorganismů, převážně bakteriemi a mikroskopickými houbami. Ve většině případů jde o konsorcia několika mikrobiálních druhů². Bakterie, oproti mikroskopickým houbám, nepředstavují tak velké riziko, s ohledem na jejich omezené enzymové vybavení a požadavek vyšší vlhkosti potřebné pro jejich růst³. V řadě případů však byly z kontaminovaných vzorků izolovány oba typy zmíněných mikroorganismů. Bučková a kol. (2014) prokázala biodegradaci želatiny tisků současně mikroskopickými houbami i bakteriemi⁴. Poškození fotografií přítomností obou mikrobiologických domén je také popsáno ve studii Sclocchi a kol. (2017)⁵. V archivních depozitářích se sleduje nejen mikrobiální kontaminace uskladněných materiálů, ale i přítomnost nežádoucích mikroorganismů v ovzduší. Přítomnost mikrobiální kontaminace v prostoru budov je ovlivněna např. prouděním vzduchu, teplotou, ale i přítomností a pohybem osob³.

Z optimálních podmínek pro růst mikroorganismů v prostředí archivů jsou nejdůležitější teplota (více než 20 °C), relativní vlhkost (více než 65 – 70 %) a v neposlední řadě složení zkoumaných materiálů, jinými slovy přítomnost vhodného zdroje uhlíku nezbytného pro růst mikroorganismů⁵⁻⁷.

Pro identifikaci mikroorganismů přítomných na archiváliích lze využít klasické metody založené na kultivaci na agarových půdách, kdy získáme jednotlivé čisté izoláty, které mohou být následně identifikovány. Tyto klasické metody jsou vhodné pouze pro mikroorga-

nismy kultivovatelné za laboratorních podmínek, což zahrnuje pouze malé procento mikrobiálních druhů⁸. Naprostá většina mikroorganismů je v laboratorních podmínkách stále nekultivovatelná, ačkoli ve zkoumaném prostředí se přirozeně vyskytují⁹. V posledních letech se proto rozšířily takzvané metagenomické analýzy, které jsou založeny na izolaci celkové DNA nebo RNA z testovaného materiálu a následně je přítomnost mikroorganismů vyhodnocena sekvenací tzv. next-generation sequencing. Výhoda těchto metod je, že jsou vysoce citlivé a jsou tedy vhodné pro zkoumání kultivovatelných, obtížně kultivovatelných i nekultivovatelných organismů^{7, 10}.

Izolace mikroorganismů

Odběr vzorků

Pro izolaci mikroorganismů z archiválií je nutné použít co nejšetrnější metodu odběru vzorků, při které nebude poškozen jejich povrch. Výběrem vhodné metody pro odběr z fotografických a filmových archivních materiálů se zabývala ve své studii Hricková a kol. (2019), ve které bylo porovnáno šest různých metod odběru mikroorganismů: suchý stěr vatovou tyčinkou, suchý stěr štětečkem, otisk na vlhký filtrační papír, otisk na suchou houbičku, otisk na suchý samet a otisk na kultivační médium Hygicult. Vhodnost těchto metod byla vyhodnocena mikroskopicky sledováním povrchu fotografického materiálu, ze kterého byl odběr proveden. Jediná metoda, která nezpůsobila žádné poškození povrchů, ať už se jednalo o albumin, kolodium nebo želatinu, byl otisk na suchou houbičku, jako je například stěrový tampon PUR-Blue (BioIng, s. r. o., CZ). Vybraná metoda byla proto doporučena pro monitoring kontaminace zmíněných archivních fotomateriálů¹¹.

Pro monitorování mikrobiální kontaminace ovzduší v archivech lze použít dvě metody – spady nebo aeroskop^{3, 12}. Princip aeroskopu je založen na nasávání předem zvoleného objemu vzduchu, a jeho přímým kontaktem s kultivačním médiem v otevřené Petriho misce. Po kultivaci při vhodné teplotě je výsledkem počet mikroorganismů ve zvoleném objemu vzduchu. Oproti tomu sedimentační technika spadů využívá přímého kontaktu agarového média se vzduchem ve sledované oblasti a výsledkem je nárůst mikroorganismů odpovídající době expozice otevřené misky s agarovým růstovým médiem. Metoda odběru vzduchu aeroskopem má nesporné výhody ve srovnání se spadovou metodou. Analyzuje totiž větší objem vzduchu za mnohem kratší dobu a díky zvolenému objemu lze přesně určit počet mikroorganismů¹³. Aeroskop byl využit například ve studii Rojase a kol. (2012) při analýze ovzduší v sedmi historických budovách, ve kterých byly uchovávány knihy a fotografický materiál. Byla zde prokázána vysoká míra mikrobiální kontaminace ve všech testovaných prostorech. Díky použité metodě bylo zachyceno více mikroorganismů za kratší dobu¹².

Izolace čisté mikrobiální kultury

Z mikroorganismů, které přežily vzorkování i transportní stres, se v dalším kroku kultivačními metodami získají čisté kolonie¹⁴. Růst mikroorganismů je limitován podmínkami prostředí, ve kterém se vyskytují. V první řadě se jedná o dostupnost vhodných živin, relativní vlhkost, teplotu, pH a koncentraci kyslíku^{15, 16}. Pro prvotní izolaci bakterií a mikroskopických hub se v archivech využívají většinou komerčně dostupná širokospektrální kultivační média. Pro mapování mikrobiální kontaminace archivních fotografií a filmů, byly v několika studiích použity agary se sladovým extraktem (MEA) a bramborové agary s dextrózou (PDA). Oba agary jsou vhodné pro kultivaci mikroskopických hub a kvasinek. Pro potlačení současného růstu bakterií jsou do těchto půd přidávány antibiotika. Pro záchyt bakterií byl využit například Luria Bertani agar (LB10), škrobový nebo živný agar¹⁷.

Kultivační metody byly využity také Sclocchim a kol. (2013), kteří monitorovali mikrobiální kontaminaci na fotografických materiálech. Pro záchyt bakterií použili živný agar a mikroskopické vláknité houby byly kultivovány právě na agarech MEA a PDA. Přítomnost xerofilních druhů plísní, které jsou schopné růstu při nízké vodní aktivitě a vysoké koncentraci zdroje uhlíku, byla navíc sledována pomocí média DG18 (dichloran-glycerol). Vedle různých druhů mikroskopických hub byly získány i jednotlivé druhy bakterií. Většina plísní byla zařazena do rodů *Alternaria*, *Cladosporium* a *Trichoderma*. Konkrétní druhy bakterií zmíněny nebyly¹⁸.

Komplexní média, která se většinou v archivech využívají, zachytí pouze malou část mikrobiálních druhů. Nejsou vhodné například pro obtížně kultivovatelné nebo pomalu rostoucí mikrobiální populace. Média bohatá na živiny podporují růst rychle rostoucích mikroorganismů na úkor pomalu rostoucích druhů, které mohou vytvářet kolonie až po několikátý denní kultivaci. Může tak dojít k předčasnému ukončení kultivace

v době, kdy pomalu rostoucí druhy ještě nezačaly tvořit viditelné kolonie. Navíc, jejich růst může být inhibován rychle rostoucími mikroorganismy^{19, 20}. Možnost, jak zvýšit záchyt a diverzitu mikroorganismů, které se na archiváliích vyskytují, je současně použití médií s různým obsahem živin¹⁵. Například pomocí Reasonerova R2A agaru lze kultivovat pomalu rostoucí bakterie, jejichž růst je podporován nízkou koncentrací živin (po 0,5 g/L škrobu a dextrózy). Médium navíc obsahuje pyruvát sodný, který zvyšuje regeneraci mikroorganismů vystavených stresovým podmínkám²¹. Tímto způsobem byly úspěšně izolovány dříve nekultivovatelné druhy z různých typů životního prostředí¹⁵.

K izolaci jednotlivých kolonií se používají tři techniky. První možností je metoda křížového roztěru (tzv. čárkování), která je založena na postupném zředování kultury. Druhou možností je metoda roztěru, kdy se na dané kultivační médium rozetře 100 µl kultury a dále metoda přelivu, kdy se vytemperovaným médiem přelije 1 ml kultury. Tyto metody jsou založeny na desítkovém ředění vzorku s cílem získat jednotlivé kolonie. Konfirmace čistoty se před identifikací potvrzuje mikroskopicky a jednotlivé kolonie různých mikroorganismů se dále mohou identifikovat biochemickými testy, spektrometricky pomocí MALDI-TOF nebo za použití molekulárně-biologické metody – polymerázové řetězové reakce (PCR) a následné sekvenace²².

Identifikace mikroorganismů

Identifikace bakterií pomocí biochemických testů

Izolovanou kulturu lze identifikovat na základě jejich biochemických vlastností. Do jednotlivých rodů lze bakterie zařadit na základě jejich růstu na selektivních či chromogenních médiích, díky přítomnosti specifických substrátů či inhibitorů. Na trhu je dostupná řada komerčních souprav, které jsou určeny pro různé skupiny mikroorganismů a jsou založeny na jejich biochemických vlastnostech²². Příkladem testovacích souprav, založených právě na biochemických reakcích, jsou soupravy API kity (existují soupravy pro gramnegativní tyčinky, stafylokoky, kvasinky, a další), ENTEROtest vhodný pro čeleď *Enterobacteriaceae*, STREPTOtest24 pro rozlišení streptokoků a enterokoků nebo například ANAEROtest 23 pro identifikaci anaerobů^{23, 24}. Někdy však získané výsledky mohou být zavádějící. V případě, že se jedná o nový druh, který ještě není v příslušné databázi, ale využívá substráty podobně jako druh z databáze, může být identifikace nesprávná. V případě, že není jasné, který druh lze ve vzorku očekávat, jako je tomu často v environmentální mikrobiologii, je vhodné tyto metody kombinovat s molekulárně-biologickými²⁵.

Identifikace mikroorganismů pomocí MALDI-TOF

Hmotnostní spektrometrie je analytická metoda založená na analýze poměru hmotnosti ku náboji různých sloučenin²⁶. Jejím základním principem je ionizace molekul a následné stanovení iontů a jejich rozpadových produktů ve vakuu²⁷. Nejrozšířenější variantou je využití ionizace laserem za přítomnosti matrice v kombinaci s detektorem doby letu, MALDI-TOF MS, z anglického matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry²⁶. Směs matrice a vzorku je za-

sažena laserem, čímž dojde k ionizaci. Ionty jsou poté urychlovány v elektrickém poli a separovány v hmotnostním analyzátoru podle jejich poměru hmotnost/náboj. Po opuštění elektrického pole vstoupí ionty pulsem do letové trubice, kde letí různou rychlostí v závislosti na jejich hmotnosti²⁷.

MALDI-TOF MS se v poslední době stále častěji používá pro identifikaci izolovaných jednodruhových kolonií mikroorganismů. Nelze ji použít pro stanovení více druhů ve směsi. Další limitací použití je databáze referenčních mikroorganismů, kterou má používaný přístroj k dispozici²⁷. Vzorek pro měření představuje jednu kolonii, která je nanášena na speciální ocelovou destičku pro MALDI-TOF MS. Kolonie je následně překryta speciální maticí, například kyselinou sinapovou, α -kyano-4-hydroxyskořicovou nebo 2,5-dihydroxybenzoovou^{28, 29}. Pokud má mikroorganismus silnou buněčnou stěnu, jako je tomu v případě kvasinek a mikroskopických hub, je vhodné před překrytím maticí zařadit nejprve extrakční krok s využitím ethanolu, acetonitrilu a kyseliny mravenčí. Tento krok lze provést rychleji přímo na ocelové destičce přidáním kyseliny mravenčí na vysušený vzorek²⁶.

V práci Krakové a kol. (2018) byla použita metoda MALDI-TOF MS pro identifikaci mikroorganismů izolovaných z archivovaných knih. Nejčastěji izolované bakterie byly *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Microbacterium aerolatum* a *Staphylococcus succinus*. Nejčastěji izolované mikroskopické vláknité houby byly *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *P. spinulosum* a *Rhodotorula mucilaginosa*³⁰. V současné době se MALDI-TOF MS využívá hlavně v klinické a potravinářské mikrobiologii. V dostupných databázích jsou tedy zatím převážně mikroorganismy významné pro tato dvě odvětví.

Identifikace mikroorganismů založené na polymerázové řetězové reakci (PCR)

Analýzy využívající PCR, z anglického polymerase chain reaction, jsou založeny na amplifikaci (namnožení) vybrané oblasti DNA pomocí specifických primerů³¹. Vlastní reakce se skládá ze tří kroků, které se několikrát opakují: denaturace DNA – oddělení obou vláken, nasednutí krátkých nukleotidů (primerů) na jednotlivá vlákna, dosyntetizování druhého vlákna s pomocí DNA polymerázy. Během jednoho cyklu se počet molekul (části) DNA zvýší dvakrát. Obvykle reakce probíhá v 30 – 35 cyklech³². Vlastní stanovení začíná izolací DNA ze vzorku. Pro tyto účely lze využít komerční kity, například, Qiagen DNeasy kit, který je velice účinný, co se týče kvality a kvantity získané DNA³³.

Nejvýznamnější pro genotypovou identifikaci bakterií je gen ribozomální RNA (rRNA), konkrétně podjednotka 16S. Tento gen je univerzální, vyskytuje se tedy u všech prokaryot, ale zároveň obsahuje konzervativní i variabilní oblasti, které jsou specifické pro daný taxon.³¹

Molekulární identifikace mikromycet je založena na použití ITS regionů (internal transcribed spacer). Tato nekódující oblast je velmi citlivá, protože je v genomu organismu obsažena v několika kopiích jako součást tandemově opakované jaderné rDNA. Tyto oblasti mají díky evoluci větší variabilitu v sekvenci mezi blíže pří-

buznými druhy než konzervativnější kódující regiony rRNA genů. Díky tomu ITS region poskytuje větší taxonomické rozlišení.¹⁰

Následujícím krokem po amplifikaci specifických úseků DNA (jimiž jsou například gen 16S rRNA nebo region ITS, jež jsou zmíněny výše) je sekvenace³⁴. Metoda sekvenace umožňuje zjistit pořadí bází v genomech, a následně tak identifikovat různé organismy. Metoda se stala technicky proveditelnou na konci šedesátých let díky enzymové dideoxy Sangerově metodě^{35, 36}. Tato metoda umožňuje sekvenaci pouze jednotlivých vzorků, tzn. DNA izolovanou z čistých izolátů, které byly získány pomocí kultivace, a tak ji nelze používat pro zpracování komplexních vzorků, které často obsahují stovky až tisíce různých DNA (metagenomické analýzy)³⁷.

Kvantitativní PCR

Další možností využití PCR je tzv. kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR), která využívá fluorescenční značku, díky které lze sledovat amplifikaci a kvantifikaci produktů v reálném čase³⁸. Fluorescenční značkou může být nespecifické barvivo, interkalující se do dvouřetězcové DNA (SYBR Green) nebo sonda (například TaqMan sonda), která je specifická pro námi vybranou sekvenci. Pro vyhodnocení mikrobiální kontaminace archiválií pomocí qPCR lze využít dvě strategie. První možností je zhodnocení míry (kvantity) mikrobiální kontaminace fotografického materiálu i ovzduší^{39, 40}. V tomto případě musí být nejdříve ze vzorku (fotografický materiál nebo ovzduší) izolována celková metagenomová DNA. Ta se izoluje většinou pomocí komerčních kitů přímo ze stěrky, která byla využita k odběru vzorku z fotografického materiálu. V případě sledování kontaminace ovzduší se přímo v aeroskopu používá speciální filtr (např. PTFE filtry s porozitou 0,22 μ m, $\varnothing$ 90 mm od Merck Millipore, USA). Po izolaci DNA následuje amplifikace cílových genů, které jsou vhodné pro kvantifikaci mikromycet (ITS region) nebo bakterií (16S rRNA gen). Takto získáme informaci o celkové kontaminaci, ne však o zastoupení jednotlivých druhů.

Druhý přístup využívá amplifikace genů specifických pro určité druhy mikroorganismů. Pro gen hemolysinu lze využít pro identifikaci bakterie *Bacillus cereus*⁴¹, která byla izolována z knih³⁰. Dalším příkladem je gen *pgsB* kódující enzym biosyntézy kyseliny poly- γ -glutamové pro detekci *Bacillus amyloliquefaciens*⁴². Pro identifikaci a taxonomickou klasifikaci druhů rodu *Staphylococcus* se jako užitečné ukázaly vysoce konzervované geny *hsp60* (kódující protein teplotního šoku) a *tuf* (kódující elongační faktor). Pro koagulasa negativní druhy rodu *Staphylococcus* se jako vhodný gen prokázal *sodA* kódující superoxid dismutasu s manganem⁴³. Druhy rodu *Bacillus* a *Staphylococcus* se již podařilo identifikovat na kinematografických filmech uložených v archívech⁴⁴.

V dnešní době se qPCR využívá pro rutinní analýzy v laboratořích klinické a potravinářské mikrobiologie. Výhodami této metody jsou vysoká citlivost a reprodukovatelnost⁴⁵. Metoda qPCR je vhodná například pro přesnou a rychlou kvantifikaci mikroskopických hub, což bylo využito při studiu kontaminace historických budov a pergamenů mikromycet pomocí genu β -ak-

tinu⁴⁶. Díky vysoké citlivosti a malému objemu vzorku, který snížil možnost poškození památek při vzorkování, jej autoři doporučili i pro mapování dalších kulturních památek. Nicméně, využití v environmentální mikrobiologii, a tím i při studiích kontaminace kulturních památek, je však stále vzácná^{47, 48}. Jedním z důvodů jsou také poměrně vysoké finanční náklady na analýzy metodami molekulární biologie ve srovnání s náklady na klasické kultivační metody⁴⁸.

Metagenomické přístupy identifikace mikroorganismů

Metagenomika je založena na analýze celkové genetické informace přítomné ve vzorku. Tak může poskytnout komplexní informace o zastoupení všech mikrobiálních druhů kontaminujících uchovávané archiválie. Tento přístup, byl poprvé použit koncem 90. let, avšak pro studium mikroorganismů kontaminující předměty v depozitářích se rozšířil především v posledních deseti letech⁴⁹. Princip je založen na odběru cílového vzorku, izolaci celkové metagenomové DNA (většinou se využívají komerční kity), amplifikaci genu 16S rRNA (bakterie) a ITS regionu (mikromycety) pomocí PCR a identifikaci nukleové kyseliny na základě vysokokapacitního sekvenování, založeného na paralelním čtení bází z více templátů DNA. V současné době lze pro tyto účely efektivně využít techniky sekvenování nové generace NGS, z anglického next-generation sequencing. Jejich další výhodou je i snižující se cena analýz jednoho vzorku^{2, 37}. Technologie NGS jsou dnes již komerčně dostupné a zahrnují pyrosekvenování (Roche 454) nebo platformu Illumina, která se v poslední době využívá nejvíce⁵⁰.

Metoda sekvenace – Roche 454

Jedná se o první úspěšnou techniku NGS, která využívá pyrosekvenování⁵¹. Je založena na detekci uvolňovaného pyrofosfátu během syntézy DNA. Během kaskády enzymových reakcí, jež začíná inkorporací známého nukleotidu, vzniká viditelné světlo, které je úměrné počtu začleněných nukleotidů⁵². Metoda je výhodná s ohledem na relativně dlouhé čtecí délky a relativně vysokou rychlost^{51, 53}. Mezi nevýhody patří vyšší finanční náklady a také výskyt možné systematické chyby ve čtecím rámci⁵⁴. Tato sekvenáční metoda byla například využita pro identifikaci mikroskopických hub a řas na budovách v britském Belfastu, kde je většina budov postavena z pískovce, jenž je celosvětově významným stavebním materiálem pro stavbu kulturních památek. Místo bylo vybráno s ohledem na celoročně nízké teploty a časté srážky. Pyrosekvenováním zde byla zjištěna vysoká taxonomická rozmanitost, a to převážně vzácných druhů⁵⁵. Dalším příkladem je studie Rosado a kol. (2014), kde byla metoda využita pro popis mikrobiálních populací na nástěnných malbách v kostele a paláci v Portugalsku. Mimo pyrosekvenování byly v tomto případě využity k identifikaci mikroorganismů i klasické metody kultivace. Ve srovnání s kultivační metodou byla pyrosekvenováním logicky stanovena vyšší biodiverzita. Podařilo se identifikovat 60 různých druhů plísní patřících například do rodů *Penicillium*, *Cladosporium*, *Aspergillus* a bakterií z rodů jako například *Streptococcus*, *Lactobacillus* či *Anaerococcus*⁵⁶.

Metoda sekvenace – Platforma Illumina

Illumina, známá také jako Solexa, byla původně použita v environmentální mikrobiologii, kdy rozšířila počet stanovených mikrobiálních druhů mikroorganismů^{53, 57}. Metoda využívá principu amplifikace jednořetězcových fragmentů vytvořených denaturací, za vzniku klastřů, které obsahují klonované DNA fragmenty⁵⁸. V kroku samotné sekvenace je využita polymeráza spolu se čtyřmi fluorescenčně odlišně značenými nukleotidy, které mají chemicky inaktivované 3' OH skupiny. Modifikace zajišťuje, že do každého cyklu bude zahrnuta pouze jedna příslušná báze. Po každém začlenění je provedena excitace a je odblokována 3' OH skupina, aby mohl být v dalším cyklu začleněn další nukleotid⁵⁷. Signál je zachycen pomocí CCD technologie⁵⁸.

Tato metoda je široce využívána pro různé aplikace, a to díky jednoduchosti a rychlosti analýzy, poměrně vysoké hloubce sekvenování, a vysoké přesnosti^{51, 54, 59}. Uvádí se, že v porovnání s metodou pyrosekvenování Roche 454 jsou finanční náklady na metodu Illumina 100x nižší⁶⁰. Díky této metodě lze navíc získat větší množství sekvencí. Avšak kvůli relativně krátké čtecí délce představuje pro mikrobiální plošné studie určitá omezení. Platí totiž, že čím delší je sekvence, tím přesnější je taxonomické zařazení. To však bylo překonáno platformou MiSeq, která je vhodná i pro delší čtecí délky⁵³.

Sekvenování pomocí platformy Illumina bylo využito například pro analýzu mikrobiálních komunit na celulosových materiálech^{30, 61}. Ve studii Szulc a kol. (2018) bylo identifikováno 10 rodů mikroskopických hub, kdy dominoval rod *Lecanorales*, a více než 26 rodů bakterií. Nejvíce byly zastoupeny rody *Gluconobacter* nebo *Ralstonia* sp⁶¹. Krakové a kol. (2018) se podařilo identifikovat 112 bakteriálních rodů, kde převažoval rod *Actinobacteria* a 179 rodů mikromycet, kde byl nejvíce zastoupen rod *Agaricomycetes*³⁰. Dalším příkladem je studie Dydy a kol. (2018), ve které byla metoda Illumina použita pro mikrobiologické zhodnocení historických kamenných objektů⁶² nebo studie Miglioreho a kol. (2019), ve které byly analyzovány mikroorganismy na pergamenech⁶³.

Z těchto příkladů je zřejmé, že pomocí metagenomických analýz je možné získat více informací o mikrobiální kontaminaci uchovávaných předmětů a identifikovat i obtížně kultivovatelné druhy mikroorganismů, které se nacházejí v životaschopném, ale nekultivovatelném fyziologickém stavu (VBNC = viable but non-culturable) a nerostou tedy za kultivačních podmínek v laboratoři⁶⁴⁻⁶⁶. Do tohoto stavu se bakterie dostávají při dlouhodobém vystavení nepříznivým podmínkám, jako jsou nutriční hladovění, extrémní teploty, osmotický stres, změny pH a další. Předpokládá se, že značná část mikrobiálních populací se v přírodě vyskytuje ve stavu VBNC⁶⁷. Podmínky pro resuscitaci zpět do kultivovatelného stavu, se liší pro různé bakterie. Jedná se o komplikovaný proces a pouhé odstranění indukčních faktorů nemusí být pro resuscitaci dostačující. U některých bakterií je resuscitace dokonce nemožná⁶⁶.

Nevýhodou metagenomických analýz DNA je to, že celková DNA je izolovaná jak z živých, tak i z mrtvých mikroorganismů přítomných ve vzorku. Při cílené detekci metabolicky aktivních mikroorganismů, je nutné

zařadit i analýzu RNA. Její množství je totiž úměrné metabolické aktivitě buněk⁶⁸. V tomto případě musí být ze vzorku izolována metagenomická RNA, ale velkou nevýhodou jsou nižší výtěžky a její nestabilita³⁴.

Závěr

Záměrem tohoto článku bylo zhodnocení a shrnutí metod používaných pro záchyt a identifikaci mikroorganismů, převážně bakterií a plísní, které kontaminují a znehodnocují archiválie uchovávané v depozitářích. Metody odběru vzorku a jeho zpracování jsou v první řadě ovlivněny jeho původem a složením (papír, fotomateriál, pergameny, zdívo, kůže, dřevo apod.). Během odběru nesmí dojít v žádném případě k poškození analyzovaného vzorku. Pro izolaci a následné identifikaci mikroorganismů lze v zásadě použít dva různé postupy: klasický postup, který je založený na kultivaci mikroorganismů na agarových půdách a moderní postup založený na analýze nukleových kyselin (DNA, RNA), nesoucích informace o jednotlivých mikroorganismech. V současné době se využívá i sekvenování celého metagenomu, které umožňuje zachytit téměř celé spektrum přítomných mikroorganismů⁶⁹.

Literatura

1. Abrusci C, Martin-Gonzalez A, Del Amo A, et al.: *International Biodeterioration & Biodegradation* 56(1), 58 (2005).
2. Perito B, Cavalieri D and Iop (2018). *Florence Heritage-Tech – the Future of Heritage Science and Technologies*.
3. Borrego S, Guimet P, De Saravia SG, et al.: *International Biodeterioration & Biodegradation* 64(2), 139 (2010).
4. Buckova M, Puskarova A, Sclocchi MC, et al.: *Polymer Degradation and Stability* 108, 1 (2014).
5. Sclocchi MC, Krakova L, Pinzari F, et al.: *Microbial Ecology* 73(4), 815 (2017).
6. Bertron A: *Materials and Structures* 47(11), 1787 (2014).
7. Sanmartin P, Dearaujo A and Vasanthakumar A: *Microbial Ecology* 76(1), 64 (2018).
8. Amann R, Fuchs BM and Behrens S: *Current Opinion in Biotechnology* 12(3), 231 (2001).
9. Wang XZ, Zhao XH, Li HB, et al.: *Research in Microbiology* 167(9-10), 731 (2016).
10. Michaelsen A, Pinzari F, Ripka K, et al.: *International Biodeterioration & Biodegradation* 58(3-4), 133 (2006).
11. Hricková K, Nováková M, Benetková B, et al. (2019). Využití pur houbičky při mikrobiologickém průzkumu fotografických a filmových archivních fondů, XVII. Seminář restaurátorů a historiků, Jihlava.
12. Rojas TI, Aira MJ, Batista A, et al.: *Grana* 51(1), 44 (2012).
13. Salustiano VC, Andrade NJ, Brandao SCC, et al.: *Brazilian Journal of Microbiology* 34(3), 255 (2003).
14. Albrecht A, Witzemberger R, Bernzen U, et al.: *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 14(1), 81 (2007).
15. Vartoukian SR, Palmer RM and Wade WG: *Fems Microbiology Letters* 309(1), 1 (2010).
16. Basu S, Bose C, Ojha N, et al.: *Bioinformation* 11(4), 182 (2015).
17. Tepla B, Demnerova K and Stiborova H: *Journal of Cultural Heritage* (2020).
18. Sclocchi MC, Damiano E, Mate D, et al.: *International Biodeterioration & Biodegradation* 84, 367 (2013).
19. Davis KER, Sangwan P and Janssen PH: *Environmental Microbiology* 13(3), 798 (2011).
20. Kato S, Yamagishi A, Daimon S, et al.: *Applied and Environmental Microbiology* 84(19), (2018).
21. Horgan SE, Matheson MM, McLoughlin-Borlace L, et al.: *Journal of Medical Microbiology* 48(7), 701 (1999).
22. Stursa P, Uhlik O, Kurawova V, et al.: *Plant Soil and Environment* 55(9), 389 (2009).
23. Ayhan DK, Temiz A, Sana FA, et al.: *Annals of Microbiology* 69(9), 895 (2019).
24. Bogacz M, Morawiec T, Smieszek-Wilczewska J, et al.: *Biomed Research International* 2019, (2019).
25. Busse HJ, Denner EBM and Lubitz W: *Journal of Biotechnology* 47(1), 3 (1996).
26. Wieser A, Schneider L, Jung JT, et al.: *Applied Microbiology and Biotechnology* 93(3), 965 (2012).
27. Pavlovic M, Huber I, Konrad R, et al.: *The Open Microbiology Journal* 7, 135 (2013).
28. Lay JO: *Mass Spectrometry Reviews* 20(4), 172 (2001).
29. Seng P, Rolain JM, Fournier PE, et al.: *Future Microbiology* 5(11), 1733 (2010).
30. Krakova L, Soltys K, Otlewska A, et al.: *International Biodeterioration & Biodegradation* 131, 51 (2018).
31. Gonzalez JM and Saiz-Jimenez C: *Journal of Separation Science* 27(3), 174 (2004).
32. Ochman H, Gerber AS and Hartl DL: *Genetics* 120(3), 621 (1988).

Porovnání klasického kultivačního a metagenomického přístupu bylo tématem několika publikací. Ve studiích Sclocchiho a kol. (2017), Krakové a kol. (2018) nebo Liuho a kol. (2018) bylo prokázáno, že tyto dva metodické přístupy jsou z hlediska záchytu přítomných mikroorganismů prakticky nesrovnatelné. Výsledky získané molekulárně biologickými metodami s následným sekvenováním umožnily detekci mnohonásobně vyšší biodiverzity než metody závislé na kultivaci^{5, 30, 70}. Z toho vyplývá, že metody nezávislé na kultivaci jsou vhodnější pro popis mikrobiálních společenství, ale pro celkovou charakteristiku detekovaných mikroorganismů zůstává stále nejlepší volbou kombinace obou technik^{70, 71}. Fyziologické vlastnosti mikroorganismů a jejich enzymové vybavení přímo související se schopností degradovat uchovávané archiválie lze totiž vyhodnotit pouze po získání jednotlivých druhů v čisté kultuře¹⁵.

Poděkování

Tato práce byla podpořena projektem č. DG18P020-VV062 financovaným Ministerstvem kultury České republiky.

Literatura (pokračování)

33. Mattei V, Murugesan S, Al Hashmi M, et al.: *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 9, (2019).
34. Kolbert CP and Persing DH: *Current Opinion in Microbiology* 2(3), 299 (1999).
35. Ansorge WJ: *New Biotechnology* 25(4), 195 (2009).
36. Korch J and Turner SW: *Current Opinion in Structural Biology* 22(3), 251 (2012).
37. Shokralla S, Spall JL, Gibson JF, et al.: *Molecular Ecology* 21(8), 1794 (2012).
38. Bustin SA: *Methods* 50(4), 217 (2010).
39. Bach HJ, Tomanova J, Schlöter M, et al.: *Journal of Microbiological Methods* 49(3), 235 (2002).
40. Schena L, Nigro F, Ippolito A, et al.: *European Journal of Plant Pathology* 110(9), 893 (2004).
41. Cattani F, Barth VC, Nasario JSR, et al.: *Journal of Dairy Science* 99(4), 2617 (2016).
42. Yong XY, Zhang RF, Zhang N, et al.: *Bioresource Technology* 129, 477 (2013).
43. Poyart C, Quesne G, Boumaila C, et al.: *Journal of Clinical Microbiology* 39(12), 4296 (2001).
44. Abrusci C, Marquina D, Santos A, et al.: *Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry* 185(2-3), 188 (2007).
45. Nygard AB, Jorgensen CB, Cirera S, et al.: *Bmc Molecular Biology* 8, (2007).
46. Ettenauer J, Pinar G, Tafer H, et al.: *Frontiers in Microbiology* 5, (2014).
47. Mackay IM: *Clinical Microbiology and Infection* 10(3), 190 (2004).
48. Sterflinger K and Pinar G: *Applied Microbiology and Biotechnology* 97(22), 9637 (2013).
49. Escobar-Zepeda A, De Leon AVP and Sanchez-Flores A: *Frontiers in Genetics* 6, (2015).
50. Morozova O and Marra MA: *Genomics* 92(5), 255 (2008).
51. Adamiak J, Otlewska A, Tafer H, et al.: *International Biodeterioration & Biodegradation* 131, 11 (2018).
52. Ronaghi M: *Genome Research* 11(1), 3 (2001).
53. Jeon YS, Park SC, Lim J, et al.: *Journal of Microbiology* 53(1), 60 (2015).
54. Dewey FE, Pan S, Wheeler MT, et al.: *Circulation* 125(7), 931 (2012).
55. Cutler NA, Oliver AE, Viles HA, et al.: *International Biodeterioration & Biodegradation* 82, 124 (2013).
56. Rosado T, Mirao J, Candeias A, et al.: *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 406(3), 887 (2014).
57. Shendure J and Ji HL: *Nature Biotechnology* 26(10), 1135 (2008).
58. Liu L, Li YH, Li SL, et al.: *Journal of Biomedicine and Biotechnology* (2012).
59. Wu LY, Wen CQ, Qin YJ, et al.: *Bmc Microbiology* 15 (2015).
60. Degnan PH and Ochman H: *Isme Journal* 6(1), 183 (2012).
61. Szulc J, Otlewska A, Ruman T, et al.: *International Biodeterioration & Biodegradation* 132, 157 (2018).
62. Dyda M, Decewicz P, Romaniuk K, et al.: *International Biodeterioration & Biodegradation* 131, 2 (2018).
63. Migliore L, Perini N, Mercuri F, et al.: *Scientific Reports* 9, (2019).
64. Tholozan JL, Cappelletti JM, Tissier JP, et al.: *Applied and Environmental Microbiology* 65(3), 1110 (1999).
65. Oliver JD: *Fems Microbiology Reviews* 34(4), 415 (2010).
66. Zhao XH, Zhong JL, Wei CJ, et al.: *Frontiers in Microbiology* 8, (2017).
67. Bodor A, Bounedjoum N, Vincze GE, et al.: *Reviews in Environmental Science and Bio-Technology* 19(1), 1 (2020).
68. Saiz-Jimenez C and Gonzalez JM: *Aerobiologia* 23(2), 89 (2007).
69. Robin JD, Ludlow AT, Laranger R, et al.: *Scientific Reports* 6, (2016).
70. Liu ZJ, Zhang YH, Zhang FY, et al.: *Frontiers in Microbiology* 9, (2018).
71. Spring S, Schulze R, Overmann J, et al.: *Fems Microbiology Reviews* 24(5), 573 (2000).

Souhrn

Branyšová, T., Demnerová, K., Stiborová, H.: Mikroorganismy kontaminující audiovizuální a fotografické památky kulturního dědictví: izolace a identifikace

Historické kinematografické materiály a fotografie podléhají při uchovávání za nevhodných podmínek biodegradaci. Jedná se o nežádoucí změny materiálu způsobené činností mikroorganismů. Postupně se mohou projevovat změnou barvy, struktury až celkovou degradací materiálu. Sledování mikrobiální populace vyskytující se na skladovaných archiváliích a v ovzduší depozitářů, dává možnost vybrat vhodné metody pro jejich odstranění aplikací vhodných dezinfekčních prostředků. V předloženém článku je uveden přehled izolačních a identifikačních metod, které lze využít pro zmapování cílových mikrobiálních populací. Klasické kultivační metody zachycují mikroorganismy schopné růstu na kultivačních půdách. Pro identifikaci izolovaných mikroorganismů lze využít biochemické testy, hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF nebo molekulárně-biologické metody. Širší spektrum mikrobiálních druhů lze identifikovat sekvenční analýzou DNA, izolované z odebraných vzorků.

Klíčová slova: izolace mikroorganismů, identifikace mikroorganismů, metagenomika, sekvenování nové generace

Summary

Branyšová, T., Demnerová, K., Stiborová, H.: Microorganisms contaminating audiovisual and photographic culture heritage: isolation and identification

Historical cinematographic materials and photographs are subject to biodegradation when stored under inappropriate conditions. In this process undesirable material changes occur caused by microorganisms. Gradually, they manifest themselves by color and structural changes, or complete degradation of the materials. Monitoring of the microbial populations on archival records and in the atmosphere of depositories give us the possibility to select suitable methods for their removal by application of suitable disinfectants. This article presents an overview of isolation and identification methods that can be used to map the microbial populations of interest. Traditional culture methods capture microorganisms capable of growing on culture media. For isolates identification the following methods can be used: biochemical tests, mass spectrometry MALDI-TOF or molecular biology methods. To identify a broader range of microbial species from the samples, sequencing analyses of the isolated DNA have become prevalent in recent years.

Keywords: microbial isolation, microbial identification, metagenomics, next-generation sequencing

BIOLOGICKÁ DOSTUPNOST A AKTIVITA RESVERATROLU VE STRAVĚ

Michaela Rollová

Ústav Biotechnologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze; rollovam@vscht.cz

Úvod

Fenolové sloučeniny jsou považovány za jednu z nejvýznamnějších skupin sloučenin v rostlinné říši¹. V současné době jsou polyfenolové látky studovány především v souvislosti s jejich vlivem na lidské zdraví. Podrobné studium metabolismu přírodních polyfenolů je instrumentálně náročné a mohlo se tak úspěšně rozvíjet teprve v posledních letech využitím moderních analytických metod.

Účinnost polyfenolových látek ve stravě je ovlivněna složením a strukturou daných sloučenin, jejich funkčními skupinami a také možnými synergickými nebo antagonistickými interakcemi těchto komponent mezi sebou, s ostatními složkami potravy i v rámci metabolismu po přijetí organismem. Klíčovou roli v biologické dostupnosti polyfenolů, a tím ovlivněné biologické aktivitě polyfenolů, má střevní mikroflóra. Polyfenoly s vysokou molekulovou hmotností jsou rozkládány mikroorganismy do řady lépe absorbovatelných nízkomolekulárních fenolických metabolitů, čímž je zlepšena jejich biologická dostupnost i účinnost.

Resveratrol, zástupce polyfenolů ze skupiny stilbenů, si získal pozornost mnoha vědců i široké veřejnosti. Díky svým vlastnostem je resveratrol potencionálním kandidátem na léčivo s vícespektrální terapeutickou aplikací². Jeho neuroprotektivní vlastnosti jsou předmětem několika nedávných studií^{3, 4}. Dnes se již resveratrol díky svým pozitivním účinkům a vlivům na lidský organismus využívá ve formě doplňků stravy jako preventivní prostředek proti řadě onemocnění⁵. Resveratrol se jako biologicky aktivní látka přirozeně vyskytuje ve stravě, avšak jeho biologické účinky jsou silně omezené jeho nízkou biologickou dostupností, která je také překážkou rozvoje jeho terapeutických aplikací⁶.

Polyfenoly ve stravě

Díky nepřetržitě se zdokonalujícím separačním a identifikačním metodám, lze při analýze potravin získávat přesnější údaje o obsahu a koncentraci polyfenolů v potravě a upřesnění jejich chemických struktur a interakcí⁷⁻⁹. Pomocí nových technologií lze také dokázat i jiné než pouze antioxidační účinky polyfenolů. V databázi vědecké literatury Web of Science bylo od roku 2008 vydáno více než 60 tisíc článků zabývajících se polyfenoly (Web of Science, www.webofknowledge.com, klíčová slova: polyphenols, k datu 01. 03. 2020). Důvodem zvýšené pozornosti a zájmu o polyfenoly, kromě již zmíněné biologické aktivity, je i skutečnost, že rostlinné fenolové a polyfenolové látky zvyšují biologickou dostupnost potravin a léků, jichž jsou tyto sloučeniny součástí.

V naší současné společnosti je konzumace potravin obsahujících zmíněné sloučeniny nedostatečná, a pro-

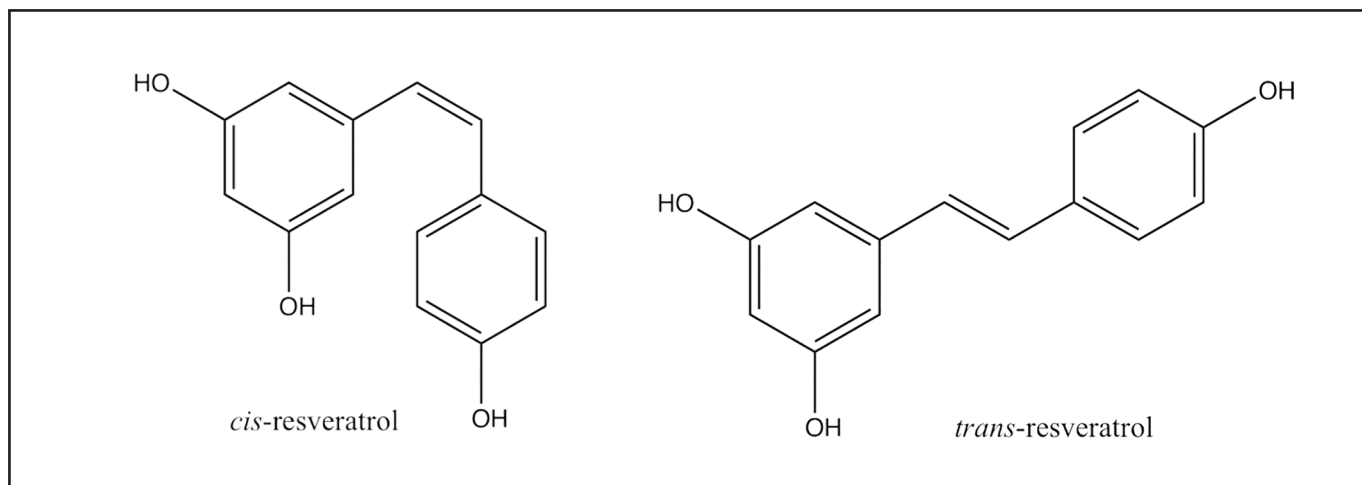
to odborníci doporučují jejich příjem zvýšit. Dle Světové zdravotnické organizace je doporučený průměrný denní příjem přibližně 250 g zeleniny a 150 g ovoce, toto množství umožní dostatečný denní příjem fenolových látek, který činí minimálně 100 mg¹⁰. Koncentrace polyfenolů se liší u různých druhů, ale i u stejného druhu rostlinných potravin a to v závislosti na jednotlivých zemích i ročních obdobích ale i např. způsobu zpracování potravin¹¹. V některých rostlinných potravinách dosahuje koncentrace polyfenolů až 500 mg na 100 g potravin. Vzhledem k tomu, že polyfenoly částečně vznikají i jako ochrana proti býložravcům, vysoké koncentrace lze nalézt především na vnějších částech rostlinných potravin jako je jablečná nebo bramborová slupka, listová zelenina, kakaové či kávové boby a obiloviny¹²⁻¹⁶. Největším a nejbohatším zdrojem polyfenolů je bezesporu barevné ovoce, obzvláště malé plody, a zelenina. Největší podíl na celkovém příjmu polyfenolů v lidské stravě mají hroznové víno, jablka, pomeranče a zelené fazole¹⁷.

Resveratrol

Resveratrol, strukturním názvem 3,4',5-trihydroxystilben, je elektronově bohatá molekula se dvěma aromatickými benzenovými kruhy vzájemně spojenými ethylenovým můstkem. Oba geometrické isomery (*trans*- a *cis*- isomer, viz Obr. 1) se v rostlinném materiálu obvykle vyskytují jako směs, v níž většinou převládá *trans*-isomer, který je samovolně přeměňován na *cis*-isomer vystavením UV záření nebo i slunečnímu svitu^{18, 19}.

Resveratrol je fytoalexin, jehož syntéza v rostlinách může být vyvolána mikrobiálními infekcemi, mechanickým poškozením, ultrafialovým zářením či expozicí ozonu^{20, 21}. Resveratrol byl nalezen ve více než 72 rostlinných druzích, které patří systematicky do 31 rodů a 12 čeledí, z nichž se řada uplatňuje i v lidské výživě. Poprvé byl resveratrol izolován z podzemní části kýchavice velkokvěté, *Veratrum grandiflorum*²².

V rostlinách je resveratrol zastoupen nejčastěji v glykosylované formě *trans*-resveratrolu a jeho analogích, jako je piceatannol (*trans*- 3,4,3',5'-tetra-hydroxystilben), pterostilben (4'-hydroxy-3,5-dimethoxystilben), polydatin neboli piceid (resveratrol-3-O-β-mono-D-glukosid), oxyresveratrol (*trans*-2,30,4,50-tetrahydroxystilben) či pinosylvín (3,5-dihydroxystilben)²³, případně jsou v rostlinném materiálu přítomny dehydrooligomery resveratrolu, tzv. konstitutivní stilbeny, které jsou oxidačními produkty resveratrolu²³⁻³⁰. Resveratrol je také syntetizován v epidermis listů a lignifikovaných rostlinných tkáních, jako jsou stonky rostlin, jádra bobulí a zbytky třapin³¹⁻³⁴.



Obr. 1: Chemické struktury isomerů resveratrolu

Resveratrol ve stravě

Ve stravě je hlavním zdrojem resveratrolu ovoce, přičemž v ovoci je jeho nejznámější výskyt ve slupkách hroznů vinné révy, *Vitis vinifera*. V listech různých odrůd *Vitis vinifera* dosahuje tento polyfenol koncentrace 50 – 400 µg/g hmotnosti čerstvého (nesušeného) listu. Gram čerstvé hroznové slupky obsahuje asi 50 – 100 µg resveratrolu³⁵. Jeden litr červeného vína obsahuje cca 6 – 15 mg resveratrolu. Množství této sloučeniny se v různých typech hroznové šťávy a vína značně liší, v závislosti na odrůdě révy, vlivu životního prostředí ve vinici, podmínkách pěstování révy, technologii výroby a zpracování vína^{36, 37}. Celkové hladiny resveratrolu a jeho glykosylovaného derivátu polydatinu, se ve vínech mohou pohybovat od 0 do 25 mg/l³⁸⁻⁴². Obsah resveratrolu v červeném a bílém víně se značně liší. Vyšší obsah tohoto stilbenu v červeném víně je důsledkem dlouhodobého kontaktu mezi hroznovou slupkou a moštem během zpracovávání hroznů vinné révy v průběhu technologie výroby. Mošt na červené víno se několik dní maceruje se slupkami z hroznů, zatímco mošt bílého vína se oddělí od zbytků hroznových slupek ihned po rozemletí³⁶.

Kromě vinné révy byl resveratrol nalezen i v ořeších, cibuli, brusinkách, listové zelenině, čaji, arašíděch a v mnoha léčivých rostlinách⁴³. Resveratrol byl prokázán v kořenech podzemnice olejné, *Arachis hypogaea*, v arašíděch samotných i v arašídových produktech⁴⁴. Arašídý se vyznačují jako jediný jiný druh rostlin (než vinná réva), který obsahuje resveratrol ve významném množství a zároveň je hojně zastoupen i v lidské stravě^{43, 45}.

Biologická dostupnost a aktivita polyfenolů

Vliv zdravotních účinků polyfenolů závisí na konzumovaném množství a jejich biologické dostupnosti. Nejhojnějšími polyfenoly v naší stravě nemusí být nezbytně ty, které mají nejlepší biologickou dostupnost⁴⁶. Biologická dostupnost polyfenolů je zkoumána se zaměřením na rychlost a rozsah intestinální absorpce polyfenolů.

Různé polyfenoly se vstřebávají s různou účinností, jelikož jsou rozsáhle metabolizovány střevními a jaterními enzymy a střevní mikroflórou. Absorpce těchto sloučenin je ovlivněna především jejich chemickou strukturou a jejich modifikacemi (např. glykosylace, esterifikace, methylace a polymerace), které mají značný vliv jejich metabolizaci⁴⁷. Biologická aktivita polyfenolových látek obsažených v potravě může ovlivňovat mikroorganismy vyskytující se v trávicím traktu a to jak z hlediska jejich zastoupení, tak i působení jednotlivých druhů.

Bylo zjištěno, že polyfenoly, které jsou v nativním stavu přítomné ve formě glykosidů, jsou v lidském organismu podrobeny částečné deglykosylaci, aktivnímu i pasivnímu transportu do krevního oběhu, biotransformacím v játrech a vylučování ve formě svých metabolitů a jejich konjugátů. Biologická aktivita těchto přírodních látek byla potvrzena zejména v oblasti indukce biotransformačních enzymů, inhibice přeměny prekarcinogenů na karcinogeny *in vivo*, antioxidační aktivity aj.⁴⁷.

Vzhledem k tomu, že většina potravinářských výrobků, které jsou denně konzumovány, jsou zpracované potraviny nikoliv čerstvé suroviny, je důležité sledovat, jakým způsobem se mění potravinářská matrice a složení potraviny během zpracování, neboť tyto změny často mění koncentraci a biologickou dostupnost polyfenolů. Obsahy polyfenolů závisí kromě typů ovoce a zeleniny na aspektech, jako jsou podmínky růstu (klima, půda atd.), ale i skladování a zrání.

Způsoby úpravy ovoce a zeleniny, jako sušení vymrazováním (lyofilizace), mletí či tepelné zpracování způsobují významné ztráty velkého množství polyfenolů. Tyto poklesy polyfenolových látek ve stravě jsou zapříčiněny především narušením buněčných organel a enzymatickými degradacemi polyfenolů. Některé úpravy potravy bohaté na polyfenolové látky však mohou mít i velice pozitivní a významný účinek na jejich biologickou dostupnost v důsledku zvýšeného přístupu trávicích enzymů. Například u mletí a ohřívání potravin se zvyšuje riziko degradace a oxidace polyfenolů, ale na druhé straně může změkčit nebo narušit buněčné stěny, což usnadňuje uvolňování polyfenolů během trávení⁴⁸.

Významné účinky na biologickou dostupnost polyfenolů má, jak již bylo zmíněno výše, také typ matrice a množství dávky polyfenolových látek ve stravě. Většina konzumovaných polyfenolů se získává z pevných potravin. Ačkoli pevné, složitější potravinové matrice mohou zpožďovat dostupnost polyfenolů, mohou také stabilizovat určité sloučeniny nebo nabízet ochranu před dalšími reakcemi až do dosažení místa absorpce⁴⁹. Výsledky studie Goldberg a kol.⁵⁰ zabývající se vlivem polyfenolů na lidské zdraví naznačují, že i pro srovnatelně jednoduché tekuté potraviny mohou rozdíly mezi matricemi, jako je přítomnost alkoholu, vlákniny nebo jiných živin, významně ovlivnit biologickou dostupnost polyfenolů.

Biologická dostupnost a aktivita resveratrolu

Přípravky obsahující resveratrol byly využívány odedávna v japonské lidové medicíně Kojo-kon k léčbě opařenin a spálenin, zánětlivých onemocnění (plísňových, bakteriálních), aterosklerosy, poruch metabolismu tuků a pro celou řadu dalších terapeutických účelů. Plevelná rostlina křídlatka japonská (*Polygonum cuspidatum*), vyskytující se především v Asii, je jedním z nejbohatších zdrojů resveratrolu. Extrakty z jejích kořenů se významně využívají v orientální medicíně.

V současnosti je známo, že při příjmu určitého množství resveratrolu a současně snížení příjmu potravy (kalorické restriktce), se prodlužuje životnost širokého spektra druhů organismů, od kvasinek až po savce⁵¹. Bhatt a kol.⁵² zjistili, že užívání 250 mg resveratrolu denně má pozitivní vliv na glykemickou hodnotu *diabetes mellitus* druhého typu. Terapeutický potenciál resveratrolu byl prokázán také studií Baur a kol.⁵³ na myších krmených vysokokalorickou stravou, kterým se prodloužila doba života a zlepšily motorické funkce díky příjmu resveratrolu. Tato zajímavá studie nastínila nové přístupy léčby onemocnění souvisejících s obezitou a stárnutím. Existují mnohé důkazy, že resveratrol zpomaluje nebo zcela zabraňuje nástupu chronických onemocnění, jejichž riziko se zvyšuje s přibývajícím věkem, jako je například diabetes^{54, 55}, Alzheimerova choroba^{56, 57}, kardiovaskulární onemocnění^{54, 55, 58-63} včetně infarktu myokardu, arytmií, hypertenze, hypertrofie, zánětu vedoucího k fibróze, aterosklerózy a trombózy. Resveratrol indukuje neuroprotektici^{56, 62} a inhibuje proliferaci lidských rakovinných buněčných linií^{55, 56, 60, 63, 64}.

Co se týče biologické dostupnosti, *in vivo* studie Bertelli a kol.⁶⁵ na myších, potkaních a psech naznačují, že resveratrol je absorbován a distribuován v krevním oběhu, lze ho tedy detekovat v krvi a v řadě orgánů. Resveratrol se rychle metabolizuje rozsáhlou glukuronidací prvního průchodu (I fáze trávení) a dále se modifikuje jak v játrech, tak v buňkách střevního epitelu^{60, 66-68}. Biologické účinky resveratrolu *in vivo* se tedy zdají být silně omezeny jeho nízkou biologickou dostupností, což je překážkou rozvoje jeho terapeutických aplikací. V této souvislosti se dnes stále více studií zaměřilo na navrhování nových forem resveratrolu a překonávání jeho špatné rozpustnosti, omezené stability, vysoké metabolizace a nízké biologické dostupnosti.

Molekulární a biologické mechanismy působení resveratrolu nejsou dosud dostatečně popsány a jsou stále předmětem výzkumu. Většina dosavadních testů byla provedena pouze *in vitro*. Do budoucna lze říci, že výzvy spočívají především v přenosu výsledků ze studií vlivu resveratrolu na zvířatech do klinického výzkumu a potřebě dalších klinických testů a pokračovat ve zkoumání všech aspektů vlivu resveratrolu na lidský organismus⁶⁹.

Novým náhledem na dopad resveratrolu ve výživě a nutričních intervencích na lidské zdraví jsou možné společné mechanismy působení mezi kalorickou restriktcí a dlouhodobou suplementací resveratrole, které úzce souvisí s účinky resveratrolu na řadu genů zodpovědných za produkci sirtuinů (např. NAD-dependentní deacetylázy sirtuinu-1, SIRT1⁷⁰). Tyto enzymy jsou součástí celé řady metabolických pochodů souvisejících s buněčnými obrannými reakcemi a mohly by mít vliv na procesy souvisejícími s kardiovaskulárními onemocněními, např. úprava krevního tlaku⁷¹.

Velké množství experimentálních studií *in vivo* a *in vitro* a několik klinických studií předložilo důkazy o velkém potenciálu resveratrolu ve spojení s různými chemoterapeutiky a cílenými terapiemi. Pro zvýšení biologické dostupnosti resveratrolu se aktivní výzkum chce v budoucnu zaměřit na dodávací systémy, formulaci a modulaci metabolismu resveratrolu. Předmětem zkoumání jsou i možné interakce resveratrolu s jinými sloučeninami a vývoj více biologicky dostupných analogů dané sloučeniny^{69, 72}.

Závěr

Lidské zdraví není samozřejmé. Ovlivnit svou imunitu můžeme hned několika způsoby, z nichž pestrá a vyvážená strava plná ovoce a zeleniny je vedle aktivního životního stylu jedním z nejdůležitějších aspektů. Díky neustále se vyvíjejícím a zdokonalujícím se analytickým a metabolickým metodám a rozvíjejícímu se trendu zdravého životního stylu a výživy by mohlo dojít k širšímu uplatnění biologicky aktivních látek jak ve formě potravinových doplňků, tak ve formě celodenní stravy. Je to právě ovoce a zelenina, které kromě celé řady jiných látek obsahují také významná množství polyfenolů s antioxidační, antimutagenní, antikardiovaskulární, protirakovinotvornou a protizánětlivou aktivitou.

Polyfenolové látky se v organismu účastní řady procesů, spojených především se střevní mikroflórou a jsou proto intenzivně studovány jako molekuly potenciálně využitelné pro terapeutický zásah. Polyfenoly, jako je resveratrol, přirozeně se vyskytující v lidské stravě mohou poskytnout novou intervenční strategii, která omezí či preventivně ochrání před důsledky řady onemocnění a je tak nadějným kandidátem pro vývoj nových léčiv.

Definitivně shrnout biologickou dostupnost a biologickou aktivitu jediné polyfenolové látky je velice obtížné, protože obecně polyfenoly obsažené v jednotlivých potravinách se vyskytují ve směsi a mají tak zatím neprobádaný vzájemný synergický vliv. Tato situace by se v budoucnu mohla řešit například testováním extraktů z daných potravin bohatých právě na polyfenolové látky, a tak získat vyšší povědomí i o jejich synergickém účinku ve stravě.

Literatura

1. Naczki M and Shahidi F: *Journal of Chromatography A* 1054(1), 95 (2004).
2. Pangen R, Pharm B, et al.: *Expert Opinion on Drug Delivery* 11(8), 1285 (2014).
3. Nollet LM and Toldrá F: *Handbook of Analysis of Active Compounds in Functional Foods*, CRC Press (2012).
4. Yang L, Yang L, et al.: *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 140, 749 (2014).
5. Balcombe N, Maru R, et al. (2015). Innovitamin Organics, LLC.
6. Amri A, Chaumeil J, et al.: *Journal of Controlled Release* 158(2), 182 (2012).
7. Azmir J, Zaidul ISM, et al.: *Journal of Food Engineering* 117(4), 426 (2013).
8. de Rijke E, Out P, et al.: *Journal of Chromatography A* 1112(1), 31 (2006).
9. Robbins RJ: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(10), 2866 (2003).
10. Zloch Z: *Vojenské zdravotnické listy*, 226 (2003).
11. Kühnau J: *World Rev Nutr Diet* 24, 117 (1976).
12. Bouayed J, Deußer H, et al.: *Food Chemistry* 131(4), 1466 (2012).
13. Naczki M and Shahidi F: *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41(5), 1523 (2006).
14. Rojanathammanee L, Puig KL, et al.: *The Journal of Nutrition* 143(5), 597 (2013).
15. Rothwell JA, Perez-Jimenez J, et al.: *Database* 2013, bat070 (2013).
16. Volz RK and McGhie TK: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(21), 11509 (2011).
17. Gonzalez S, Fernandez M, et al.: *Journal of human nutrition and dietetics* 27(2), 176 (2014).
18. Chen X, He H, et al.: *Biomedical chromatography* 21(3), 257 (2007).
19. Camont L, Cottart C-H, et al.: *Analytica Chimica Acta* 634(1), 121 (2009).
20. Ignatowicz E and Baer-Dubowska W: *Polish journal of pharmacology* 53(6), 557 (2001).
21. Atanacković M, Petrović A, et al.: *Food Chemistry* 131(2), 513 (2012).
22. Takaoka M: *NIPPON KAGAKU KAISHI* 60(12), 1261 (1939).
23. McCormack D and McFadden D: *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2013, 575482 (2013).
24. Li C, Xu X, et al.: *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 26(10), 1189 (2016).
25. Seyed MA, Jantan I, et al.: *J. Agri. Food Chem.* 64, 725 (2016).
26. Mak KK, Wu ATH, et al.: *Molecular Nutrition and Food Research* 57(7), 1123 (2013).
27. Pari L and Satheesh MA: *Life Sciences* 79(7), 641 (2006).
28. Passos CLA, Ferreira C, et al.: *PLOS ONE* 10(10), e0141778 (2015).
29. López-Nicolás JM, Rodríguez-Bonilla P, et al.: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(21), 10175 (2009).
30. Szekeres T, Fritzer-Szekeres M, et al.: *Pharmaceutical Research* 27(6), 1042 (2010).
31. Langcake P and Pryce RJ: *Physiological Plant Pathology* 9(1), 77 (1976).
32. Burns J, Yokota T, et al.: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(11), 3337 (2002).
33. Gomez JE (2009). thesis, Universidade de Santiago de Compostela.
34. Smidrkal J, Filip V, et al.: *Chemické listy* 95(10), 602 (2001).
35. Jeandet P, Bessis R, et al.: *American Journal of Enology and Viticulture* 42(1), 41 (1991).
36. Daniel O, Meier MS, et al.: *Environmental Health Perspectives* 107(Suppl 1), 109 (1999).
37. Amarowicz R, Carle R, et al.: *Molecular nutrition & food research* 53(S2), (2009).
38. Ribeiro de Lima MT, Waffo-Tégou P, et al.: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47(7), 2666 (1999).
39. Ector BJ, Magee JB, et al.: *American Journal of Enology and Viticulture* 47(1), 57 (1996).
40. Goldberg DM, Yan J, et al.: *American Journal of Enology and Viticulture* 46(2), 159 (1995).
41. McMurtrey KD, Minn J, et al.: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42(10), 2077 (1994).
42. Pezet R, Pont V, et al.: *Journal of Chromatography A* 663(2), 191 (1994).
43. Sanders TH, McMichael RW, et al.: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(4), 1243 (2000).
44. Kolouchova I, Melzoch K, et al.: *Chemické listy* 99(7), 492 (2005).
45. Goldberg DM: *Clinical Chemistry* 41(1), 14 (1995).
46. Stalikas CD: *Journal of separation science* 30(18), 3268 (2007).
47. Crozier A, Jaganath IB, et al.: *Natural Product Reports* 26(8), 1001 (2009).
48. Bohn T: *Nutrition Reviews* 72(7), 429 (2014).
49. Zhu Y, Hsu WH, et al.: *PLoS ONE* 8(6), e67482 (2013).
50. Goldberg DM, Yan J, et al.: *Clinical Biochemistry* 36(1), 79 (2003).
51. Koubova J and Guarente L: *Genes & Development* 17(3), 313 (2003).
52. Bhatt JK, Thomas S, et al.: *Nutrition Research* 32(7), 537 (2012).
53. Baur JA, Pearson KJ, et al.: *Nature* 444, 337 (2006).
54. Baur JA and Sinclair DA: *Nature Reviews Drug Discovery* 5, 493 (2006).
55. Harikumar KB and Aggarwal BB: *Cell cycle* 7(8), 1020 (2008).
56. Saiko P, Szakmary A, et al.: *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 658(1), 68 (2008).
57. Anekonda TS: *Brain research reviews* 52(2), 316 (2006).
58. Das S and Das DK: *Recent Patents on Cardiovascular Drug Discovery* 2(2), 133 (2007).
59. Das DK and Maulik N: *Molecular interventions* 6(1), 36 (2006).
60. Gresele P, Cerletti C, et al.: *The Journal of nutritional biochemistry* 22(3), 201 (2011).
61. Opie LH and Lecour S: *European Heart Journal* 28(14), 1683 (2007).
62. Ami PR, Hung Wen L, et al.: *Current Medicinal Chemistry* 15(15), 1545 (2008).

Literatura (pokračování)

63. Vidavalur R, Otani H, et al.: *Experimental & Clinical Cardiology* 11(3), 217 (2006).
64. Aggarwal BB, Bhardwaj A, et al.: *Anticancer research* 24(5 A), 2783 (2004).
65. Bertelli AA, Giovannini L Fau – Stradi R, et al.: (0251-1649 (Print)), (1996).
66. Andlauer W, Kolb J, et al.: *Drugs under experimental and clinical research* 26(2), 47 (2000).
67. Vitrac X, Desmoulière A, et al.: *Life Sciences* 72(20), 2219 (2003).
68. Yu C, Shin Yg Fau – Chow A, et al.: 1907-1914(0724-8741 (Print)), (2002).
69. Wahl D, Bernier M, et al.: *Nutrition and healthy aging* 4(4), 287 (2018).
70. Elliott PJ, Walpole S, et al.: *Drugs Fut* 34(4), 291 (2009).
71. Mohar DS and Malik S: *Journal of clinical & experimental cardiology* 3(11), (2012).
72. Macáková K (2019). Habilitation thesis, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové.

Souhrn

Rollová M.: Biologická dostupnost a aktivita resveratrolu ve stravě

Správná výživa a aktivní životní styl hrají v lidském zdraví zásadní roli. Polyfenolové látky, vyskytující se především v ovoci a zelenině, mohou ovlivňovat řadu onemocnění, a to jak způsobem prevence, tak ve formě léčiv a doplňků stravy. Významným zástupcem polyfenolů, ze skupiny stilbenů, je resveratrol, který je díky svým vlastnostem potencionálním kandidátem na léčivo s vicespektrální terapeutickou aplikací. Tento článek shrnuje poznatky o biologické aktivitě a dostupnosti polyfenolových látek v potravinách se zaměřením na resveratrol. Cílem tohoto přehledu je popis polyfenolových biologicky aktivních látek ve stravě, účincích polyfenolových látek na lidský organismus a také jejich osud v organismu spojený s výzvami biologické dostupnosti, a tedy i jejich aktivitě.

Klíčová slova: resveratrol, polyfenoly, biologická dostupnost, biologická aktivita, zdraví, výživa

Summary

Rollová M.: Bioavailability and biological activity of resveratrol in the diet

Proper nutrition and active lifestyle play a key role in human health. Polyphenol substances, mainly found in fruits and vegetables, can affect a number of diseases by way of prevention and in the form of medicaments and dietary supplements. An important representative of polyphenols, from the group of stilbenes, is resveratrol. Resveratrol is, due to its properties, a potential drug candidate with multi-spectrum therapeutic application. This article summarizes the knowledge on the bioactivity and bioavailability of polyphenol compounds in food with a major focus on resveratrol. The aim of this review is to describe polyphenol biologically active substances in the diet, the effects of polyphenols on the human body and their fate in the organism associated with the challenges of their bioavailability, thus their biological activity.

Keywords: resveratrol, polyphenols, bioavailability, biological activity, health, nutrition

OBSAH

Úvodem	21
Vodičková A.: Studium mitochondrií živých buněk pomocí 3D super-rozlišovací světelné mikroskopie	22
Branyšová, T., Demnerová, K., Stiborová, H.: Mikroorganismy kontaminující audiovizuální a fotografické památky kulturního dědictví: izolace a identifikace	25
Rollová M.: Biologická dostupnost a aktivita resveratrolu ve stravě	31

CONTENT

Editorial	21
Vodičková A.: Study of mitochondria in living cells using 3D super-resolution light microscopy	22
Branyšová, T., Demnerová, K., Stiborová, H.: Microorganisms contaminating audiovisual and photographic culture heritage: isolation and identification	25
Rollová M.: Bioavailability and biological activity of resveratrol in the diet	31

REDAKČNÍ RADA

doc. Ing. Petra Lipovová, Ph.D., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (vedoucí redaktor)
prof. Ing. Jan Káš, DrSc., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (redaktor)
doc. Ing. Pavel Ulbrich, Ph.D., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (redaktor)
Ing. Michaela Marková, Ph.D., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (redaktor)
doc. RNDr. Petr Skládal, CSc., Ústav biochemie, PřF MU v Brně, Kamenice 753/5, Bohunice, 601 77 Brno (redaktor)
doc. RNDr. Marek Petřivalský, Ph.D., Katedra biochemie, PřF Palackého univerzity, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc (redaktor)
RNDr. Ivan Babůrek, CSc., Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i., Rozvojová 263, 165 02 Praha 6
doc. Ing. Radovan Bílek, CSc., Endokrinologický ústav, Národní 8, 116 94 Praha 1
prof. Ing. Alena Čejková, CSc., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6
prof. RNDr. Gustav Entlicher, CSc., Katedra biochemie PřF UK, Albertrtov 6, 128 43 Praha 2
RNDr. Milan Fránek, DrSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno
prof. Ing. Ladislav Fukal, CSc., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6
Ing. Jan Kopečný, DrSc., Ústav živočišné fyziologie a genetiky, AV ČR, v.v.i., Videňská 1083, Praha 4
prof. RNDr. Pavel Peč, CSc., Katedra biochemie, Univerzita Palackého v Olomouci, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc
doc. RNDr. Jana Pěkníková, Ph.D., Biotechnologický ústav AV ČR, v.v.i., Průmyslová 59/5, Vestec, 252 42 Jesenice
RNDr. Vladimír Vala, Teva Czech Industries, s.r.o., Ostravská 29, 747 70 Opava – Komárov
doc. RNDr. Petr Zbořil, CSc., Ústav biochemie, PřF MU, Kotlářská 267/2, 611 37 Brno

POKYNY PRO AUTORY

Rukopis musí být opatřen plným jménem autorů, jejich pracovištěm a e-mailovými adresami. Text se předkládá jako soubor MS Word (doc, docx, rtf) ve formátu jednoduchého řádkování písmem fontu Arial o velikosti 11. Rozsah není při dodržení správné publikační praxe omezen.

Článek má tyto části: Název práce, jména autorů a pracoviště, e-mailová adresa autora, úvod, vlastní text členěný do kapitol, závěr, příp. poděkování, citace literatury, český souhrn a klíčová slova a anglický souhrn a klíčová slova. Odkazy na literaturu se číslují v pořadí, v jakém přicházejí v textu a jsou uváděny formou exponentu (bez závorek) v příslušném místě textu (včetně tabulek a obrázků). Zkratky časopisů se používají podle zvyklosti Chemical Abstract Service Source Index.

Příklady citací: Horgan AM, Moore JD, Noble JE, et al.: *Trends Biotechnol.* 28, 485 (2010).

Lowestein KA: *Silicones. A Story of Research.* Wiley, New York 2006.

Fujiki M (2008): Helix generation, amplification, switching, and memory of chromophoric polymers.

In: *Amplification of Chirality, Topics in Current Chemistry* 248 (Soai K ed.), Springer, Berlin, 119–201.

Novák Z: Disertační práce, VŠCHT Praha 2008.

<http://www.fs.fed.us/research/>, staženo 3. září 2011.

Tabulky se označují římskými číslicemi. Každá tabulka je opatřena názvem a popisem umístěným nad tabulkou. Obrázky se číslují arabskými číslicemi (příklad formátu **Obr. 1:**). Každý obrázek musí být opatřen legendou, která jej činí jednoznačně srozumitelným (tj. bez nutnosti hledat nezbytné informace v textu). Obrázky nekládejte do textu rukopisu, ale zasílejte je samostatně v některém z běžných formátů např. tif, jpg (rozlišení 300 dpi).

Rukopisy je třeba zaslat e-mailem na adresu jan.kas@vscht.cz nebo na petra.lipovova@vscht.cz. Bližší informace naleznete na <http://bts.vscht.cz>.

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

The manuscript must be provided with the full name of authors, the institutions name and with e-mail addresses. Text is presented in a MS Word (doc, docx, rtf) format, single line spacing, font Arial, font size 11. The size is not restricted.

The article contains the following sections: title, authors and institutions, e-mail address of the corresponding author, introduction, text divided into chapters, conclusions, references, summary and keywords in English, summary and keywords in Czech. References are numbered according to their appearance in the text and as an exponent (without parentheses) in the appropriate place in the text.

Examples: Horgan AM, Moore JD, Noble JE, et al.: *Trends Biotechnol.* 28, 485 (2010).

Lowestein KA: *Silicones. A Story of Research.* Wiley, New York 2006.

Fujiki M (2008): Helix generation, amplification, switching, and memory of chromophoric polymers.

In: *Amplification of Chirality, Topics in Current Chemistry* 248 (Soai K ed.), Springer, Berlin, 119–201.

Novák Z: Diploma thesis, UCT Prague 2008.

<http://www.fs.fed.us/research/>, downloaded 1st September 2011.

Tables are numbered by Roman numerals. Each table is provided with a name and description placed above the table. Pictures are numbered in Arabic numerals (example format **Fig. 1:**). Each image must be provided with a legend. Pictures should be sent separately in a common format such as tif, jpg (resolution 300 dpi). Manuscripts should be sent to the e-mail address jan.kas@vscht.cz or petra.lipovova@vscht.cz. More information can be found on <http://bts.vscht.cz>.

BIOPROSPECT

Vydavatel:
BIOTECHNOLOGICKÁ SPOLEČNOST
Technická 3
166 28 Praha 6
IČ: 00570397

Zapsán do evidence periodického tisku a bylo mu přiděleno evidenční číslo:
MK ČR E 19409

Zařazen do Seznamu recenzovaných neimpaktovaných periodik
vydáváných v ČR

Tiskne:
VENICE Praha, s.r.o.
Za Hanspaulkou 13/875
160 00 Praha 6

ISSN 1210-1737 (Print)
ISSN 2570-8910 (Online) – <http://bts.vscht.cz/bioprospect.html>

Neprodejné – jen pro členy Biotechnologických společností.

Stránky biotechnologické společnosti (<http://bts.vscht.cz>)
jsou archivovány Národní knihovnou ČR (www.webarchiv.cz).