

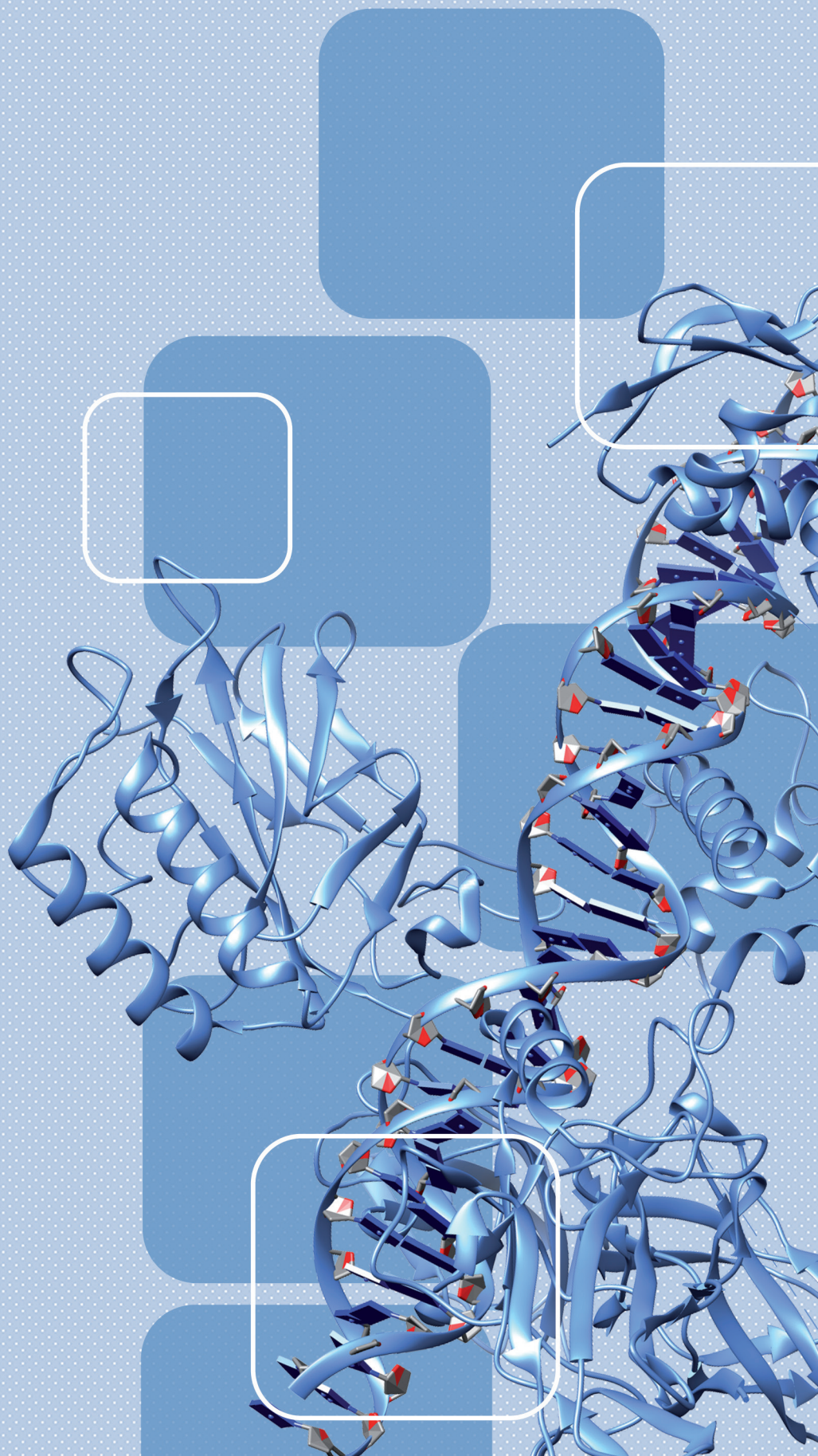
Bio

Ročník 30 • Číslo 3/2020

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,

vítáme Vás ve třetím čísle již 30. ročníku našeho Bioprospectu, které dostáváte trochu opožděně. Důvodem jsou komplikace zaviněné koronavirovou aférou, která se zdála být skoro za námi, ale virus zaútočil znovu ve druhé vlně silnější intenzitou. Přes všechna opatření, která směřují k omezení šíření viru, označovaného COVID-19, se zdá, že průlom v zastavení viru může zásadně ovlivnit pouze efektivní vakcinace.

Positivním jevem je, že farmaceutický průmysl má rozsáhlé zkušenosti s přípravou různých typů vakcín. Z nich asi 80 % připadá na lidské vakcíny a zbývajících 20 % jsou vakcíny veterinární. Z lidských vakcín zhruba 90 % tvoří vakcíny profylaktické (různé typy „očkování“) a jen asi 10 % připadá na vakcíny terapeutické. RNA a DNA vakcíny lze realizovat s menšími provozními náklady než vakcíny, jejichž příprava je založena na mikrobiální či buněčné kultivaci, a tudíž jsou i cenově výhodnější.

Pandemie COVID-19 iniciovala velký zájem o vývoj vakcín. Podle Světové zdravotnické organizace (WHO – World Health Organization) existuje v současnosti více jak 125 projektů přípravy vakcíny, přičemž 15 z nich je již v klinických zkouškách ve fázi 1 a 2 a dokonce některé již vstoupily do klinické fáze 3. Zdá se být reálné, že začátkem příštího roku by mohly být některé klinicky ověřené, vakcíny k dispozici v širším měřítku.

Koronaviry jsou jednovláknové RNA viry s pozitivní polaritou. Jejich název je odvozen od charakteristického uspořádání povrchových struktur lipidového obalu ve tvaru sluneční koróny. Dosahují velikosti kolem 120 nanometrů. Jejich genom obsahuje 30 tisíc bází, což je nejvíce mezi známými RNA viry s nesegmentovaným genomem.

První koronavirus byl prokázán u kuřat v roce 1930. Později byly koronaviry prokázány u netopýrů, velbloudů, koček, ptáků a jiných zvířat. Tento jev se označuje jako „cross-species transmission“ nebo „spillover“.

Viry, které infikují jeden druh, mutují a získávají schopnost infikovat jiný druh. První infikování člověka koronavirem bylo zřetelně prokázáno v r. 1960. Uvádí se, že asi 10 – 15 % běžných zimních nachlazení způsobují koronaviry 229E, OC43, NL63 a HKU1. První viry prokázané při běžných nachlazeních byly právě 229E a OC43. První koronavirus, který způsoboval vážné onemocnění, byl SARS-CoV (severe acute respiratory syndrom koronavirus). SARS-CoV byl detekován v listopadu 2002. Jeho genom byl identifikován Canada's National Microbiology Laboratory. SARS v mnoha směrech vykazuje podobnost s COVID-19. V období 2002 – 2014 zemřelo 774 lidí. Po 10 letech, tedy v r. 2012, byl identifikován koronavirus MERS-CoV, jehož název (MERS) je odvozen od místa prvního výskytu v Saudské Arabii (Middle East respiratory syndrom). MERS se dále rozšířil v Jižní Koreji (2015) a opět v Saudské Arabii (2018). Nabízí se otázka proč SARS-CoV nebo MERS-CoV nevyvolaly pandemii. Šíření nemoci bylo závislé na přímém kontaktu a mnozí lidé nevykazovali vůbec žádné symptomy.

Nový koronavirus SARS-CoV-2 byl objeven u nemocných pneumonií ve Wu-chanu v Čínské lidové republice a má blízký vztah k SARS-CoV. Geneticky patří k rodu *Betacoronavirus*, podrodu *Sarbecovirus*. WHO označilo šíření COVIDu-19 jako pandemii 11. března 2020 vzhledem k překotnému růstu případů onemocnění v Itálii, Íránu, Jižní Koreji a Japonsku. Vývoj pandemie lze sledovat na webu WHO. K 6. 10. 2020 bylo potvrzeno 35 347 404 onemocnění a 1 039 406 zemřelých². Věřme, že pandemií se podaří pomoci vhodných opatření a spolupráce všech občanů při jejich dodržování zvládnout.

Přejeme Vám, aby se Vám onemocnění vyhnulo a prožili jste klidné dny. Doufáme, že se potěšíte přečtením článků, které jsme pro Vás v tomto čísle připravili.

Se srdečnými pozdravy

Vaši

Jan Káš a Petra Lipová

Literatura:

1. International Biopharm, Vo. 33, No. 8, p. 16 (www.biopharminternational.com)
2. https://covid19.who.int/?gclid=CjwKCAjwzvX7BRAeEiwAsXExoyeli1PqdcYRwg36hEW3j5Cs0jLeQcmxEktla4jm7u_PjvSnyMFjrxoChCOQAvD_BwE

METODY DIAGNOSTIKY ALZHEIMEROVY CHOROBY

Anton Viskin, Tatiana Smirnova

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

Úvod

Alzheimerova demence (AD) je chronické degenerativní mozkové onemocnění, které lze definovat jako poruchu kognitivních funkcí¹⁻³ s dobře definovanými patofyziologickými mechanismy postihující střední temporální lalok a asociativní neokortikální struktury³.

Existuje familiární a sporadická forma tohoto onemocnění. Klinicky tyto dvě formy nejsou odlišitelné, ale na rozdíl od sporadické, familiární AD je autosomálně dominantní dědičné onemocnění, které tvoří asi 5 % všech případů AD. Jedná se o mutace v genech *APP*, *PSEN1* a *PSEN2*, jež způsobují zvýšenou produkci toxického amyloidu beta $A\beta_{42}$ a/nebo změnu poměru $A\beta_{42}$ k $A\beta_{40}$ s následnou tvorbou amyloidních plaků⁴. Forma $A\beta_{40}$ je dobře rozpustná ve vodě a představuje za normálních podmínek přibližně 90 % veškerého $A\beta$ produkovaného buňkou. Hydrofobní $A\beta_{42}$ tvoří pouze asi 10 % vylučovaného peptidu, ovšem u pacientů s AD představuje dominantní formu tvořící amyloidové plaky. Přítomnost plaků vede k aktivaci mikroglie a astrocytů, uvolnění cytokinů a vyvolání lokální zánětlivé odpovědi^{5, 6}. Tyto události pak mají za následek vznik oxidačního stresu či narušení iontové homeostázy (například Ca^{2+})⁷. Narušením kinázové a fosfatázové aktivity následně dochází k hyperfosforylaci proteinu tau, který se formuje do nerozpustných párových helikálních vláken a vytváří neurofibrilární klubka, jež jsou významným patologickým znakem AD⁸.

Příznaky onemocnění

V dnešní době v rozvinutých zemích přibližně 1 z 10 osob nad 60 let trpí jednou z forem demence včetně AD, přičemž třetina z nich je ve věku nad 80 let⁹. Vzhledem k věkové kategorii většiny postižených se některé příznaky AD mohou plést s typickými věkovými kognitivními změnami². Nicméně existují případy s asymptomatickým průběhem v počátečním stadiu onemocnění. Nejběžnějším časným příznakem AD je obtížné zapamatování si nově naučených informací, protože vyvolané změny obvykle začínají v části mozku zvané *hippocampus*, která ovlivňuje schopnost učení¹⁰. Jak AD postupuje mozkiem, vede ke stále závažnějším příznakům včetně dezorientace, změn nálady a chování, prohlubování zmatku o událostech, čase a místě, nepodložených podezření týkajících se rodiny a přátel, vážnější ztráty paměti a změn chování, potíží s mluvením, polykáním a chůzí. Na základě výskytu typických symptomů lze průběh AD rozdělit do tří fází: časné fáze (mild stage), mírné fáze (moderate stage) a pozdní fáze (late stage)¹¹. Z neuropatologického hlediska má AD buď typický, nebo atypický průběh, což je způsobeno rozmístěním neurofibrilárních klubek a senilních plaků v mozku. Při typickém průběhu AD je postupná atrofie hipokampu způsobena hromaděním neurofibrilárních klubek a plaků¹². Stupeň atrofie hipokampu je považován za biomarker progresu AD pro předpověď kognitivních poruch¹³. Existují však tzv. atypické případy onemocnění. Mezi takové patří hipokampus šetřící AD (Hippocampal Sparing, HpSp) a limbický predominantní AD (Limbic Predominant, LP)¹². HpSp je charakteri-

zován disproporcionací kortikálních amyloidních plaků a vůči zátěži amyloidními plakami relativně chráněným hipokampem. LP typ je charakterizován disproporcionací amyloidních plaků v hipokampu¹⁴ a nepřítomností nebo malým počtem kortikálních plaků¹⁵.

Diagnostika

Kognitivní testy

Kognitivní testy jsou určeny k odhalení počátečního stádia demence a jsou široce využívány v klinické medicíně. Ideální kognitivní test by měl být krátký, jednoduchý ve vyhodnocení, psychometricky robustní a pokrývající široké spektrum kognitivních domén. Jedním z nejvíce uznávaných a široce využívaných kognitivních testů je krátký test kognitivních schopností (Mini-Mental State Examination, MMSE). MMSE trvá zhruba 10 minut a je rozdělen do několika částí. Každá část testu je formulována tak, aby zapojila různé kognitivní schopnosti pacienta. V testu se pacientovi kladou různé otázky, například na dnešní datum, čas a místo, kde se pacient v tento okamžik nachází atd. Součástí testu jsou také různorodá zadání, jako je například napsat smysluplnou větu nebo splnit nějaký jednoduchý úkol napsaný na papíru¹⁶.

Přestože MMSE je nejvíce užívaným kognitivním testem, jeho efektivita je řadu let diskutována v mnoha studiích. Mitchell ve své metaanalýze z roku 2009 (ref.¹⁷) předpokládá, že MMSE má velmi limitovanou schopnost rozlišit pacienty s mírnou kognitivní poruchou (MCI) od zdravých jedinců. Nedávná metaanalýza z roku 2019, zabývající se hledáním vhodných krátkých a dlouhých testů pro nejefektivnější odhalení MCI a AD, ohodnotila psychometrické schopnosti souboru z 38 testů, zmíněných v předešlých studiích. Tato práce ukázala, že mezi nejvhodnější krátké (doba trvání testu do 5 minut) kognitivní testy patří rychlý test mírné kognitivní poruchy (Quick Mild Cognitive Impairment screen, Qmci) a fototest pro pacienty s MCI, a Alzheimerův rychlý test (Alzheimer's Quick Test, AQT), test na zapamatování obrázků (Scenery Picture Memory Test, SPMT) a test kognitivních poruch (Memory Impairment Screen, MIS) pro pacienty s AD. Mezi dlouhé testy (doba trvání testu od 6 do 20 minut) patří MES test (Memory and Executive Screening, MES) pro pacienty s MCI a AD, a Montrealský kognitivní test (Montreal Cognitive Assessment, MoCA) pro pacienty s AD¹⁸.

Dalším testem kognitivních schopností je test hodin. Během tohoto testu musí pacient pomocí tužky a papíru nakreslit hodiny ukazující určitý čas. Pacientovi je také zadán příklad hodin, které musí nakreslit. Tento test zahrnuje široké spektrum kognitivních schopností, například koncentraci, paměť, abstraktní myšlení a plánování¹⁹.

V tuto chvíli se neustále připravují, zkouší a hodnotí nové kognitivní testy a vylepšené verze již existujících kognitivních testů, jejichž úkolem zůstává rychlé a jednoduché rozlišení osob, trpících MCI a demencí od zdravých jedinců s pokrytím co největší oblasti kognitivních funkcí.

Neurozobrazovací techniky

Po provedení kognitivních testů je klíčovým krokem pro stanovení diagnózy AD včasná diagnostika neurozobrazovacími metodami, zejména pomocí magnetické rezonance (MR), výpočetní tomografie (CT), a pozitronové emisní tomografie (PET)²⁰. Metoda MR je jedna z nejrozšířenějších neurozobrazovacích technik a umožňuje detekovat lokální mozkovou atrofii, léze bílé mozkové hmoty, mozkový infarkt nebo nádory²¹. U pacientů s AD je pozorováno zmenšení celého mozku a především vnitřních struktur spánkového laloku^{7, 22}.

Další hojně používanou neurozobrazovací metodou je CT. CT (dříve známá jako počítačová axiální tomografie nebo CAT) je lékařský zobrazovací postup, který využívá počítačově zpracované kombinace mnoha rentgenových snímků pořízených z různých úhlů k vytvoření obrázku průřezu konkrétních oblastí skenovaného objektu. Před lety bylo CT použito k pozorování atrofie mediálního temporálního regionu, ale není snadné najít nedávné studie o CT jako zdroji diagnózy AD. Varghese a kol.²³ potvrzují, že CT se nepoužívá jako standardní technika pro včasnou diagnostiku AD. Může to být proto, že jiné metody prokázaly větší přesnost, lepší manipulovatelnost s přístrojem, a také proto, že CT je schopna prokázat pouze pozdní změny u AD²⁴.

Za nejpokročilejší neurozobrazovací metodu se považuje PET. Tato metoda je založena na využití radionuklidem značené molekuly podávané pacientovi a následném sledování její biodistribuce. U lidí postižených AD je sledován mozkový hypometabolismus glukosy s využitím 18 F značené fluorodeoxyglukosy²⁵. Tento glukosový deficit se postupně zvyrazňuje s průběhem nemoci. Navíc oblasti mozku, ve kterých je pozorován hypometabolismus, jsou anatomicky a funkčně propojené s oblastmi, kde se u nemocných ukládá A β , což umožňuje využití PET k zobrazení amyloidu. K označení amyloidů byly vyvinuty dvě radionuklidově značené molekuly – ¹¹C značený PIB (N-methyl-[11C]2-(4'-metylamino)fenyl)-6-hydroxybenzothiazol) a 18 F značený FDDNP ([18 F] 1,1-dikyno-2-[6-(dimetylamino)-2-naftalenyl]propen). Bylo prokázáno, že u lidí s AD dochází k retenci těchto molekul v oblastech mozku, o kterých je známo, že obsahují velké množství amyloidu^{20, 26}.

Biomarkery

Tradiční studie změřené na odhalení a vysvětlení patologických mechanismů různých neurodegenerativních chorob, včetně AD, využívají cílený přístup, kdy cíle jsou často určeny na bázi nějaké hypotézy vzniku studovaného onemocnění. Podobný přístup už dávno prokázal svoji prospěšnost skrze objevení klíčových faktorů patologických mechanismů. Biomarkery z tělesných tekutin mají rozhodující roli pro diagnostiku AD²⁷. V případě mozkových poruch je nejrozšířenějším zdrojem pro analýzu biomarkerů mozkomíšní mok (CSF), kde mezi nejznámější indikátory onemocnění patří amyloid beta (hrající hlavní roli v tvorbě mozkových plaků), protein tau (vyskytující se v neurofibrilárních klubkách), apoE jako nejdůležitější genetický rizikový faktor AD a další. CSF je výhodným zdrojem informací díky svému těsnému spojení s parenchymem, kde jsou mozkové proteiny vylučovány z extracelulárního prostoru přímo do moku. Nicméně odběr vzorků CSF je invazivnější a dražší metodou, proto v současné době mnoho vědeckých studií využívá dostupnějších a levnějších materiálů pro jednodušší diagnostické vyhodnocení pacientů s kognitivními poruchami, například krevní

plasmu nebo sérum²⁷. Cirkulující krev, a tedy i plazma, je však od mozku oddělena hematoencefalickou bariérou (BBB), která omezuje difúzi mikroskopických patogenů (např. bakterií) a velkých nebo hydrofilních molekul do mozkomíšního moku. Pouze malé lipofilní molekuly mohou snadněji přecházet do krve spolu s aktivně transportovanými specifickými molekulami. To znamená, že nejrelevantnější markery (tj. ty, které odrážejí to, co se děje v mozku), budou v plazmě minimálně, alespoň u zdravých osob^{1, 28}.

Existuje také výzkum, který naznačuje, že vaskulární dysregulace včetně dysfunkce BBB může být jedním z prvních markerů patologie, které nakonec vedou k diagnóze AD. Například Iturria Medina a kol.²⁹ se snažili charakterizovat časové uspořádání faktorů souvisejících s případným vznikem AD, včetně depozice A β , metabolismu glukosy, průtoku krve mozkem, aktivity neuronů v klidovém stavu pomocí MR, vlastností tkáně (strukturní MR), výkon neuropsychologických testů a hladiny periferních proteinů (v CSF a plazmě). Tito badatelé zjistili, že vaskulární dysregulace v mozku byla nejčasnějším markerem patologických příhod, následovaná špatným výkonem paměťového testu vedoucího k AD, což naznačuje, že dysfunkce hematoencefalické bariéry může být důležitým faktorem počínající neurodegenerace⁵.

Proteomické studie

Proteomické studie na různých modelech AD poskytují cenné poznatky o molekulárním základu této poruchy. Z proteomického hlediska má progresse tohoto onemocnění dopad na řadu buněčných procesů, jako je výroba energie, buněčná struktura, signální transdukcce, synaptická funkce, mitochondriální funkce a další. Každá z těchto buněčných funkcí přispívá k udržení buněčné homeostaze a dysregulace jedné nebo více z nich by mohla přispět k patologii a klinickému projevu AD^{30, 31}.

Většina výzkumů zkoumajících mozkovou tkáň je zaměřena na určení proteomických změn mezi skupinou nemocných AD a kontrolní skupinou zdravých jedinců (bez kognitivních poruch) v rámci jedné věkové kategorie³⁰. Studie z univerzity v Emory v USA, zabývající se hlubokou proteomickou analýzou vzorků mozkové tkáně získaných od nemocných AD a asymptomatického (také preklinického) AD, se pokusila zjistit, jak se proteomové složení v mozku těchto dvou skupin pacientů liší. Pomocí isobarické tandemové hmotnostní značky a prefrakcionaci se ve zmíněné studii podařilo odhalit 350 proteinů, jejichž množství se liší u skupiny lidí s AD a asymptomatickým AD, přičemž rozdíly v koncentracích nalezených proteinů není závislé na změně populace konkrétních typů buněk v mozku, což by mohlo zobrazovat biochemické změny způsobující kognitivní poruchy. Navíc se v této studii podařilo odhalit alternace v procesu splicingu RNA a identifikovat některé alternativní isoformy proteinů, které mohou mít vliv na rozvoj kognitivní dysfunkce u lidí s preklinickým AD³². Jiná proteomická studie se zaměřila na specifický protein – ApoE – a rozdíly v jeho koncentracích v mozku u pacientů s AD. Ve výsledku se podařilo odhalit skupinu proteinů, které se spolu s ApoE podílejí na procesech ovlivňujících mozkový metabolismus, zánětlivé procesy a cerebrální vaskulitidu^{30, 32}. Stojí za zmínku, že při porovnání různých proteomických studií je důležité si uvědomit, že každá studie využívá určitý způsob lyze proteinů ze vzorku mozkové tkáně. Následkem srovnání studií s různými metodikami proteinové lyze

může být nehomogenita dat, protože při využití odlišných metod dostaneme lišící se populace proteinů. Nicméně využití různorodých metod nám dává možnost zvětšení rozsahu znalostí o molekulárních změnách při AD³⁰.

Proteomické výzkumy, využívající tělní tekutiny jako analyzovaný materiál, jsou často zaměřeny na hledání potenciálních biomarkerů schopných poskytovat vyčerpávající informace pro diagnostiku a sledování vývoje neurodegenerativních onemocnění. Jako odběrový materiál pro analýzu se ve velkém množství výzkumů využívá mozkomíšní mok. Mezi již známé biomarkery AD v mozkomíšním moku patří s mikrotubuly asociovaný protein tau (MAPT) a astroprotein³³. Ve studii Sierra-Rio a kol.³⁴ byla úroveň MAPT v mozkomíšním moku 2,4x zvýšená u lidí s AD v porovnání s kognitivně zdravými jedinci. Zvýšená produkce astroproteinu jako známka astrocytosis je detekována při řadě neurodegenerativních chorob – AD, demence s Lewiho tělisky a frontotemporální demence³⁵. Proteomická studie z roku 2019 identifikovala několik proteinů s podstatně sníženou produkcí včetně MAPT a astroproteinu, které jsou součástí procesu mozkové degenerace. Mezi odhalené proteiny patří β-2-mikroglobulin (B2M), astrocytový neurotrofický faktor (MANF) a γ-řetězec HLA antigenu, také známý jako CD74³⁵. Dalším potenciálním biomarkerem AD je dendritický protein neurogranin, který je součástí procesu dlouhodobé potenciace. Podle studií Kvartsbergu z roku 2015 tento protein byl u lidí s MCI ve vyšší koncentraci v porovnání se skupinou zdravých jedinců³⁶. Neurogranin má potenciál specifického biomarkeru pro AD, protože jeho zvýšená produkce nebyla zatím nalezena u žádných jiných neurodegenerativních chorob³⁷.

Změny v plazmatických bílkovinách, metabolitech nebo dokonce v miRNA mohou odrážet buď již známé mechanismy patologie AD, včetně smrti neuronových buněk, zánětu (produkce a sekrece cytokinů a chemokinů), oxidačních mechanismů a aktivace kaskád komplementu nebo by mohla poskytnout užitečné poznatky o nových cestách podílejících se na etiologii onemocnění. Mezi nadějně kandidáty na roli krevního biomarkeru AD patří lehký neurofilament (NFL)³⁸. Kon-

centrace NFL v séru a krevní plazmě má pevnou korelaci s koncentrací této látky v mozkomíšním moku a má vyšší koncentraci u lidí jak se sporadickou, tak i familiární formou AD. Nicméně podobnou tendenci má koncentrace NFL i u několika dalších neurodegenerativních chorob^{38, 39}.

Hmotnostní spektrometrie

Pro hledání biomarkerů jsou široce využívány techniky hmotnostní spektrometrie (MS). MS je zavedený nástroj pro měření různých analytů v biologických tekutinách pro hledání potenciálních biomarkerů. Například Li a kol.⁴⁰ pozorovali rozdíly v plazmatické hladině tryptofanu, dihydrosfingosinu, fytosfingosinu a hexadekafingoninu, ve srovnání s kontrolami. Tyto výsledky naznačily poruchy metabolismu lecitinu, metabolismu aminokyselin a metabolismu fosfolipidů u onemocnění AD, které mohou být důležité pro klinickou diagnostiku a léčbu. Studie ukazuje, že k diagnostice AD lze použít metabolomiku založenou na UPLC/MS a možná jednoduchým a ekonomickým způsobem sledovat onemocnění a terapeutický postup.

MS je velmi často spojena s plynovou nebo kapalinovou chromatografií, aby provedla další separaci molekul před analýzou⁴¹. Jeho hlavní výhodou je vysoká selektivita, a proto je také preferována jako referenční metoda pro imunotesty⁴².

Závěr

Důležitým krokem k léčbě, nebo alespoň ke zpomalení průběhu onemocnění, je včasná a přesná diagnostika raných stádií AD. V posledních letech výzkum demence u starších lidí značně pokročil, avšak stále je příliš omezený. Další výzkum, který by byl schopný zlepšit diagnostická kritéria pro tuto kohortu je velmi potřebný, a to nejen k zjištění přesné diagnózy, ale také pro zlepšení kvality života postižených osob.

Poděkování

Tento výstup vznikl v rámci projektu Specifického vysokoškolského výzkumu FPBT_2020_024.

Literatura

1. Hampel H, O'Bryant SE, et al.: *Nat. Rev. Neurol.* 14(11), 639 (2018).
2. Gaugler J, James B, et al.: *Alzheimer's Dement.* 12(4), 459 (2016).
3. De-Paula VJ, Radanovic M, et al.: *Subcell Biochem* 65, 329 (2012).
4. Villamil-Ortiz JG, Barrera-Ocampo A, et al.: *J. Alzheimers, DiS.* 61(1), 209 (2018).
5. Emrani S, Lamar M, et al.: *J. Alzheimers, DiS.* 73(1), 63 (2020).
6. Schmidt M, Sachse C, et al.: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(47), 19813 (2009).
7. Sundstrom JM, Hernandez C, et al.: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 59(6), 2264 (2018).
8. Butterfield DA, Swomley AM, et al.: *Antioxid Redox Signal* 19(8), 823 (2013).
9. Zahodne LB, Ornstein K, et al.: *Am. J. Geriatr. Psychiatr.* 23(2), 130 (2015).
10. Lyketsos CG, Carrillo MC, et al.: *Alzheimer's & Dementia* 7(5), 532 (2011).
11. Gaugler J, James B, et al.: *Alzheimer's Dementia* 15(3), 321 (2019).
12. Murray ME, Graff-Radford NR, et al.: *Lancet Neurol.* 10(9), 785 (2011).
13. Jack CR, Petersen RC, et al.: *Neurology* 51(4), 993 (1998).
14. Janocko NJ, Brodersen KA, et al.: *Acta Neuropathologica* 124(5), 681 (2012).
15. Iseki E, Yamamoto R, et al.: *Neurosci. Lett.* 405(1-2), 29 (2006).
16. Arevalo-Rodriguez I, Smailagic N, et al.: *Cochrane Database of Systematic Reviews* 3, (2015).
17. Mitchell AJ: *J Psychiatr Res* 43(4), 411 (2009).
18. Deroeck E, Paul D, et al.: *Alzheimer's Research and Therapy* 11((2019).
19. Kim S, Jahng S, et al.: *Dement Neurocogn Disord* 17(3), 100 (2018).
20. Scheltens P: *European Journal of Neurology* 16(s1), 19 (2009).
21. McKhann GM, Knopman DS, et al.: *Alzheimers. Dement.* 7(3), 263 (2011); Chandra A, Dervenoulas G, et al.: *J. Neurol.* 266(6), 1293 (2019).
22. Alosco ML, Jarnagin J, et al.: *Semin Neurol* 37(05), 503 (2017).

Literatura (pokračování)

23. Varghese T, Sheelakumari R, et al.: *Neurology Asia* 18(3), 239 (2013).
24. Alberdi A, Aztiria A, et al.: *Artif. Intell. Med.* 71(1) (2016).
25. Furst AJ, Rabinovici GD, et al.: *Neurobiol. Aging* 33(2), 215 (2012).
26. Johnson KA, Fox NC, et al.: *Cold Spring Harb Perspect Med* 2(4), 23 (2012).
27. Blennow K and Zetterberg H: *J. Intern. Med.* 284(6), 643 (2018).
28. Galasko D and Golde TE: *Alzheimer's Research & Therapy* 5(2), 10 (2013).
29. Iturria-Medina Y, Sotero RC, et al.: *Nat. Commun.* 7((2016).
30. Drummond E and Wisniewski T (2019). *Alzheimer's Disease*, edited by T. Wisniewski. Brisbane (AU): Codon Publications Copyright: The Authors.
31. Swomley AM, Förster S, et al.: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Basis of Disease* 1842(8), 1248 (2014).
32. Johnson ECB, Dammer EB, et al.: *Mol Neurodegener* 13(1), 52 (2018).
33. Garden GA and Campbell BM: *Glia* 64(10), 1755 (2016).
34. Sierra-Rio A, Balasa M, et al.: *Neurodegener Dis* 16(1-2), 69 (2016).
35. Sathe G, Na CH, et al.: *Proteomics Clin Appl* 13(4), e1800105 (2019).
36. Kvartsberg H, Portelius E, et al.: *Alzheimers Res Ther* 7(1), 40 (2015).
37. Wellington H, Paterson RW, et al.: *Neurology* 86(9), 829 (2016).
38. Zetterberg H and Burnham SC: *Mol Brain* 12(1), 26 (2019).
39. Khalil M, Teunissen CE, et al.: *Nat Rev Neurol* 14(10), 577 (2018).
40. Li NJ, Liu WT, et al.: *Clin. Biochem.* 43(12), 992 (2010).
41. Cui Y, Chen XB, et al.: *Bio-Medical Materials and Engineering* 26(S2165) (2015).
42. Oe T, Ackermann BL, et al.: *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 20(24), 3723 (2006).

Souhrn

Viskin A., Smirnova T.: Metody diagnostiky alzheimerovy choroby

Alzheimerova choroba je chronické neurodegenerativní onemocnění a je nejčastější příčinou demence ve světě. Rizikovou skupinou tohoto onemocnění jsou lidé ve věku nad 60 let, přičemž ne vždy má počáteční stadium onemocnění jasně zřetelné příznaky. Z tohoto důvodu je stále důležitým krokem k léčbě, nebo alespoň k zpomalení průběhu onemocnění, včasná a přesná diagnostika.

Klíčová slova: Alzheimerova choroba, diagnostické metody, mozkomíšní mok, krevní plasma, krevní sérum, proteomika

Summary

Viskin A., Smirnova T.: Diagnostics methods of alzheimer disease

Alzheimer's disease is a chronic neurodegenerative disease and is the most common cause of dementia in the world. People at the age of 60 are a risk group for this disease, and the initial stage of the disease does not always have clear symptoms. For this reason, early and accurate diagnosis is still an important step to treat, or at least slow down the course of the disease.

Keywords: Alzheimer's disease, diagnostic methods, cerebrospinal fluid, blood plasma, blood serum, proteomics

PROTEOMICKÉ ROZLIŠENÍ RŮZNÝCH DRUHŮ RYBÍHO MASA

Anna Zubová, Ondřej Novotný, Filip Souček

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

Úvod

Jedním z největších celosvětových problémů je falšování potravin, které se může projevit buď sníženou kvalitou potraviny nebo v horším případě ohrožení zdraví spotřebitelů. Právě maso a masné výrobky jsou nejvíce falšované potraviny. Celosvětově je nejčastěji konzumované rybí maso, které má spotřebu kolem 20 kilogramů na osobu ročně. V České republice je to 5,5 kilogramu, ale spotřeba rybího masa má u nás vzrůstající tendenci.

Falšování masa je zjišťováno různými analytickými metodami. Jednou skupinou jsou elektroforetické metody, například polyakrylamidová gelová elektroforéza za přítomnosti dodecylsiranu sodného (SDS-PAGE) nebo isoelektrická fokusace (IEF). Dalšími metodami jsou metody imunologické, konkrétně se používá ELISA a dále je možné využít i chromatografické metody (HPLC) a metody hmotnostní spektrometrie.

Chemické složení rybího masa

Obecně je maso složeno především z vody, proteinů a lipidů. Právě tyto složky představují velké rozdíly ve vlastnostech masa¹ (Mlček, 2010 #1). Kromě těchto složek rybí maso obsahuje i minoritní složky, především sacharidy a minerály.

V rybím masu se pohybuje obsah vody mezi 70 – 80 %. Obsah vody úzce souvisí s obsahem tuku. Ryby s nízkým obsahem tuku mají vysoké zastoupení vody v masu (až 80 %), naopak ryby, které si do svalů ukládají větší množství tuku, obsahují nižší procentuální zastoupení vody (cca 70%)². Na obsah vody v masu má vliv více faktorů, například zvýšení obsahu vody může způsobit vyčerpání živin během pohlavního zrání či hladovění. U chovaných ryb můžeme pozorovat nižší obsah vody ve svaletch než u volně žijících jedinců a zdá se, že právě nižší obsah vody zlepšuje jejich nutriční hodnotu³.

Obvyklé rozmezí obsahu lipidů se pohybuje mezi 1 – 10%⁴. Rozdíly v procentuálním zastoupení lipidů u jednotlivých jedinců jsou velmi velké, u vyhladovělých ryb může být pouze 0,5% lipidů oproti až 20% u některých velmi dobře krmených ryb². Zastoupení lipidů u ryb může být velmi odlišné i u jednoho jedince v průběhu roku. Například obsah tuku u makrely se obsahuje od 4% na jaře až do 20% na podzim. Lipidový profil rybiho masa je charakteristický přítomností triacylglycerolů, ostatními neutrálními lipidy (steryly a vosky) a polárními fosfolipidy. Ryby, které mají nízký obsah tuku, obsahují především fosfolipidy, kdežto triacylglyceroly jsou u ryb s vyšším obsahem tuku. Vliv na obsah lipidů v rybím masě má i výživa, vlastnosti vody (salinita, teplota), pohlaví, biologický věk či cyklus tření³.

Ryby s nízkým obsahem tuku (obsahující méně než 2%) s vysokým procentem fosfolipidů mají i vyšší obsah nenasycených mastných kyselin (MK) oproti kyselinám nasyceným. Naopak ve svalu, kde je větší množství neutrálních lipidů, je nižší množství polyneenasycených mastných kyselin⁵. Různé druhy ryb se liší také svou schopností syntetizovat MK a mohou mít tedy odlišné nároky na příjem esenciálních MK. Oproti tukům rostlinného původu, které jsou bohaté na kyseliny linolovou a linolenovou, nebo tukům živočišného původu, které mají vysoké zastoupení kyselin palmitové, stearové a olejové, jsou ryby a další vodní organismy bohaté na omega-3 eikosapentaenové (EPA) a dokosapentaenové kyseliny (DPA)³. Na složení MK v rybím masě má vliv i teplota vody, čím je voda chladnější, tím je zastoupení nenasycených MK vyšší.

Obvyklý obsah proteinů v rybím masě je 16 – 22%, výjimečně může být menší než 6% nebo větší než 26%³. Svalové proteiny jsou rozděleny do tří skupin podle rozpustnosti ve vodě na rozpustné sarkoplasmatické proteiny, nerozpustné myofibrilární proteiny a nerozpustné stromatické proteiny. Rybí maso obsahuje velké množství myofibrilárních proteinů (70 – 90%), které jsou nerozpustné ve vodě a rozpustné v roztocích solí, a naopak malé množství stromatických proteinů (3 – 10%) oproti suchozemským živočichům. Chrupavčité ryby (např. jeseter) mají větší procentuální zastoupení stromatických proteinů než ryby kostnaté, což je většina současně žijících ryb³.

Mezi sarkoplasmatické proteiny patří zejména enzymy, ale patří sem i hemové proteiny (myoglobin a hemoglobin), které jsou zodpovědné za barvu masa. Tyto proteiny jsou ve vodě rozpustné a jejich zastoupení se pohybuje mezi 10 – 25%.

Nejvíce zastoupenou skupinou proteinů jsou myofibrilární proteiny, jejichž nejvýznamnější zástupci jsou aktin a myosin tvořící myofibrilu a umožňující svalovou kontrakci. U ryb je jejich dominantní zastoupení výraznější než u ostatních živočichů. Tato skupina je významná z hlediska kvality potravin, jejich funkční vlastnosti mohou ovlivnit jednak kvalitu produktů z mořských plodů, tak i schopnost masa podstoupit určitý proces. Změny textury, které se stanou během zamrazování produktů z mořských plodů v důsledku denaturace těchto proteinů, vedou ke snížení kvality produktů⁶.

Poslední skupinou jsou stromatické proteiny, mezi které patří zejména kolagen, ale i retikulin a elastin. Kolagen je extracelulární protein, který je základní stavební jednotkou pojivových tkání. Množství pojivových tkání má souvislost s křehkostí masa, například u ryb, na rozdíl od jiných živočichů, se díky malému množství

pojiv neobjevuje téměř tvrdnutí masa. Ryby obsahují oproti savcům velmi malé množství kolagenu, jehož aminokyselinové složení je pro danou skupinu živočichů charakteristické. Složení rybiho kolagenu se liší od savčího v tom, že obsahuje nižší množství prolinu a hydroxyprolinu, tedy aminokyselin, které jsou pro savčí kolagen typické. Důsledkem je poté například jeho nižší teplota denaturace než u savců⁴.

V masě se mohou vyskytovat i volné aminokyseliny, které ovlivňují chuť masa. Obsah aminokyselin je u ryb obvykle větší než u suchozemských zvířat, bývá v rozmezí 0,5 – 2% váhy svalu⁵. Vyhladovělé ryby obsahují méně volného histidinu, ale obsahují více dipeptidu anserinu⁷. Nejzastoupenější volnou aminokyselinou u lososa i cejna je derivát cysteinu – taurin⁸. Další volné aminokyseliny přítomné v rybím masě jsou hlavně lysin, glycin, alanin, histidin a glutamát, hojně se vyskytují i dipeptidy anserin a karnosin.

Analýza proteinů v masě

Obsah proteinů v potravinách může být zjišťován různými metodami založenými na odlišných analytických principech.

Jednak může být obsah proteinů stanovován nepřímo prostřednictvím určení množství celkového dusíku a následně převedení na množství proteinů pomocí konverzního faktoru. Jako nepřímá metoda stanovení bílkovin je používána především univerzální Kjeldahlova metoda. V Kjeldahlově metodě se organický dusík nejprve za přítomnosti kyseliny sírové a síranu měďnatého jako katalyzátoru přeměňuje na síran amonný, který následně reaguje s hydroxidem sodným za vzniku amoniaku, jehož koncentrace se stanovuje titrací. Alternativou k této metodě je metoda Dumasova, ve které je dusík uvolňován v plynné formě a je stanoven tepelně vodivostním detektorem po odstranění oxidu uhličitého a vodných aerosolů⁹.

Obsah proteinů může být stanovován také přímo analýzou aminokyselin. Peptidové vazby lze hydrolyzovat a uvolněné zbytky aminokyselin jsou poté určeny chromatograficky. Součet aminokyselin pak představuje obsah proteinů v analyzované vzorku.

Běžně používanou analytickou metodou pro analýzu proteinů je spektrofotometrie, jejíž principem je absorpce elektromagnetického záření v ultrafialové nebo viditelné části spektra (200 – 800 nm). Mezi spektrofotometrické metody používané k analýze proteinů patří například Bradfordova metoda, která je založena na reakci barviva Coomassie Blue s ionizovatelnými skupinami na proteinu.

Metody určování živočišného původu masa

Identifikace živočišného druhu masa v masných výrobcích si zaslouží zvýšenou pozornost. Kromě ekonomických a právních důsledků je určení živočišného druhu důležité kvůli různým zdravotním požadavkům, specifickým potravinovým alergiím a také náboženství. Identifikace pravosti masa může odhalit podvodné nahrazení druhů masa s vyšší obchodní hodnotou nižšími a levnějšími alternativami¹⁰. Analytické metody k určení živočišného druhu jsou založeny buď na analýze proteinů nebo DNA.

Metody využívající DNA jsou různé techniky založené na polymerázové řetězové reakci – PCR. Na tomto prin-

cipu byly vytvořeny i ultrarychlé metody, které se dnes využívají¹¹.

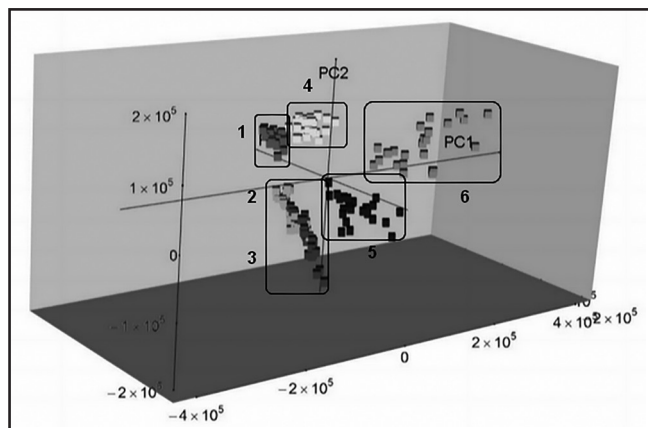
Metody založené na proteinech zahrnují elektroforetické, imunologické, chromatografické, spektroskopické a hmotnostně-spektrometrické techniky¹². Mezi elektroforetické metody používané pro identifikaci živočišného původu masa patří SDS-PAGE) IEF a dvou-rozměrná elektroforéza (2-DE). SDS-PAGE metoda byla použita pro identifikaci druhů ryb v syrových i vařených vzorcích. Pro tuto metodu byly použity roztoky obsahující SDS a močovinu jako extrakční činidla. Extrakce roztoky s SDS byla méně ovlivněna stavem vzorku (syrový/vařený) než u vzorků s močovinou¹³. IEF s využitím močoviny byla schopna rozlišit jednotlivé druhy s minimálním vlivem tepelného zpracování¹⁴. Tepelně zpracované maso bylo zkoumáno S. A. Sarah v roce 2016 s identifikací kandidátních peptidů charakteristických pro vepřové maso¹⁵. Martinez a Friis použili 2-DE k identifikaci blízce příbuzných druhů ryb a dokázali tak identifikovat sarkoplasmatické i myofibrilární proteiny¹⁶.

Hlavní imunologická metoda pro analýzu proteinů je ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), která využívá interakci protilátky a antigenu a jejíž výhody jsou jednoduchost, vysoká citlivost a přesnost. Byly vytvořeny specifické polyklonální protilátky proti svalovým proteinům tak, aby byly schopny rozlišit druhy ryb jako je platýs, treska, úhoř, sardinka a další¹⁷. Speciálně pro ryby byla vytvořena také polyklonální antiséra proti 36 kDa termostabilnímu proteinu ze směsi různých rybích druhů k detekci přítomnosti rybiho svalu (bez určení konkrétního druhu) v potravinářských výrobcích¹⁸. I když jsou již vyvinuté imunotesty snadno použitelné a mají vysokou citlivost, jejich použití je omezeno z řady důvodů. Zprvu potřebují k ověření analýzu referenčních vzorků pro vyloučení zkřížené reaktivity s jinými nebo podobnými druhy. Zadruhé nejsou vhodné pro forenzní účely zpracovaných potravinářských výrobků vzhledem k tomu, že zpracování může změnit trojrozměrnou strukturu bílkovin, čímž dojde ke ztrátě či úpravě cíleného místa pro protilátku¹⁹.

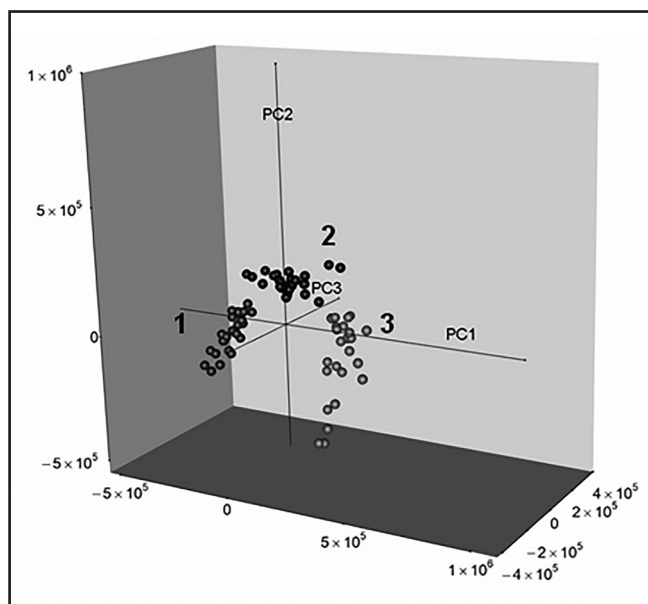
Spektroskopie je založena na absorpci elektromagnetického záření určitých vlnových délek molekulami vzorků. Pro identifikaci druhového zastoupení v mase byly použity infračervená spektroskopie a UV-VIS spektroskopie²⁰. Právě infračervená spektroskopie patří k metodám používaným pro detekci falšování potravin²¹.

Poslední zmíněné hmotnostně-spektrometrické metody se zakládají na ionizaci analyzovaných molekul a následné separaci podle poměru hmotnosti a náboje. V roce 2015 S. Wen s kolegy zkoumali rozdílnou digesti čtyř druhů masa (hovězího, vepřového, kuřecího a rybiho) pomocí metod hmotnostní spektrometrie spojující ionizaci pomocí matrice a analyzátor doby letu (MALDI-TOF) a LC-MS/MS. *In vivo* byl zkoumán žaludeční a jejunální obsah krys, které byly krmeny těmito druhy masa, a *in vitro* bylo maso štěpeno nejprve pepsinem a následně trypsinem. Po štěpení pepsinem bylo peptidové složení hovězího a vepřového masa více podobné než vzorky kuřat a ryb, ale stravitelnost *in vivo* byla největší u vepřového masa a nejmenší u hovězího masa. Jejich výsledky by mohly interpretovat rozdíly ve fyziologických funkcích po požití různého druhu masa²². Jiný výzkum proběhl v roce 2015, kdy s. M.A. Sentandreu snažil detekovat kuřecí maso v masných směsích pomocí LC-MS. Vyvinuli metodu, pomocí které je možné detekovat i například 0,5% obsah kuřecí-

ho masa kontaminující vepřové maso a tato metoda je použitelná i pro vysoce zpracované potraviny, které nelze analyzovat například pomocí ELISA²³. Jednou z metod hmotnostní spektrometrie je právě MALDI-TOF, která byla použita v naší práci pro rozlišení šesti druhů rybiho masa²⁴. Jednalo se o mražené nebo chlazené syrové maso tří sladkovodních a tří mořských druhů ryb, jmenovitě *Cyprinus carpio* (kapr obecný), *Esox lucius* (štika obecná), *Oncorhynchus mykiss* (pstruh duhový), *Salmo salar* (losos obecný), *Scomber scombrus* (makrela obecná) a *Theragra chalcogramma* (treska pestrá). Před analýzou hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF byly vzorky štěpeny trypsinem a výsledky byly vyhodnoceny metodou analýzy hlavních komponent (PCA). Výsledkem byl trojrozměrný graf, ve kterém se oddělovaly téměř všechny druhy ryb s výjimkou štiky a kapra (Obr. 1). Pokud ale takto byly vyhodnoceny jen vzorky sladkovodních ryb, podařilo se rozlišit všechny druhy (Obr. 2). Výhodou této metody je její rychlost, ale podobně jako ostatní dosud používané techniky, její použití zatím není rutinního charakteru a do budoucna je potřeba ji lépe rozvinout a zjistit limity jejího použití v praxi.



Obr. 1: Lineární kombinace hlavních komponent syrového masa v trojrozměrném prostoru. Vzorky masa jsou označeny následovně: 1 – treska, 2 – štika, 3 – kapr, 4 – pstruh, 5 – makrela, 6 – losos.



Obr. 2: Analýza hlavních komponent syrového masa sladkovodních ryb. 1 – kapr, 2 – štika, 3 – pstruh.

Závěr

Zjišťování pravosti rybího masa je dnes stále ještě nedořešeným problémem, vzhledem k množství prodáváného masa, počtu různým rybích druhů a také limitům používaných bioanalytických metod. V tomto článku jsme se zaměřili na autentizaci syrového rybího masa vybraných druhů mořských a sladkovodních ryb,

vždy se však jednalo jen o vzorky z jednoho druhu ryb. Pokud by se jednalo o analýzu masných směsí, většina z představených metod analyzujících proteiny by nevykázala jednoznačné či průkazné výsledky. Je proto potřeba stále hledat metody, které by dokázaly jednoznačně určit původ rybího masa, ať již v syrové nebo tepelně opracované formě, či ve směsích s jinými druhy mas.

Literatura

1. Mlček J, Rop O, et al.: *Chem. listy* 104(9), (2010).
2. Murray J and Burt J: *Aberdeen, UK: Torry Research Station* (2001).
3. Haard NF: *Food Res. Int.* 25(4), 289 (1992).
4. Guérin C: *Handbook of Food Science and Technology 3: Food Biochemistry and Technology* 65 (2016).
5. Ingemansson T, Olsson NU, et al.: *J. Sci. of Food Agric.* 57(3), 443 (1991).
6. Sotelo C, Piñeiro C, et al.: *Eur. Food Res. Technol.* 211(6), 443 (2000).
7. Amano H, Fujiyoshi T, et al.: *Nippon Suisan Gakkaishi* 55(2), (1989).
8. Hata M, Sato Y, et al.: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish (Japan)* (1988).
9. Mæhre HK, Dalheim L, et al.: *Foods* 7(1), 5 (2018).
10. Farag MR, Alagawany M, et al.: *Adv. Anim. Vet. Sci.* 3(6), 334 (2015).
11. Song K-Y, Hwang HJ, et al.: *Food Chem.* 229(341) (2017).
12. Alikord M, Momtaz H, et al.: *J. Food Meas. Charact.* 12(1), 145 (2018).
13. Piñeiro C, Barros-Velázquez J, et al.: *Electrophoresis: An International Journal* 20(7), 1425 (1999).
14. Etienne M, Jérôme M, et al.: *Electrophoresis: An International Journal* 20(10), 1923 (1999).
15. Sarah S, Faradalila W, et al.: *Food Chem.* 199, 157 (2016).
16. Martinez I, Friis TJ, et al.: *Electrophoresis* 22(8), 1526 (2001).
17. Asensio L, González I, et al.: *J. Agric. Food Chem.* 51(5), 1169 (2003).
18. Carrera E, Terni M, et al.: *Food Agric Immunol.* 25(4), 569 (2014).
19. Verrez-Bagnis V, Sotelo CG, et al.: *Regulation (EU)* 625 (2017).
20. Rannou H and Downey G: *Anal Commun.* 34(12), 401 (1997).
21. Rohman A, Erwanto Y, et al.: *Meat Sci.* 88(1), 91 (2011).
22. Wen S, Zhou G, et al.: *Proteomics* 15(21), 3688 (2015).
23. Sentandreu MA, Fraser PD, et al.: *J. Proteome Res.* 9(7), 3374 (2010).
24. Souček F: *Bakalářská práce, VŠCHT Praha* 2020.

Souhrn

Zubová A., Novotný O., Souček F: Proteomické rozlišení různých druhů rybího masa

Rybí maso je významným zdrojem bílkovin a omega-3 mastných kyselin, které tvoří nedílnou součást zdravé výživy. Tato práce se zabývá proteinovým složením rybího masa. Rybí maso obsahuje zhruba 16 – 22 % bílkovin, které se dají rozdělit do tří skupin – sarkoplasmatické, myofibrilární a stromatické. Hlavní bílkovinnou složkou jsou myofibrilární proteiny, mezi které patří zejména aktin a myosin. Metody, kterými lze analyzovat proteiny v mase, jsou založeny na různých principech – elektroforetické, imunologické, chromatografické, spektroskopické a metody hmotnostní spektrometrie. V naší studii byla použita konkrétně MALDI-TOF MS pro rozlišení syrového rybího masa vybraných druhů ryb.

Klíčová slova: Druhy ryb, proteinové složení rybího masa, analytické metody pro určení proteinů v mase, hmotnostní spektrometrie, MALDI-TOF, PCA

Summary

Zubová A., Novotný O., Souček F: Proteomic differentiation of varied species of fish meat

Fish meat is an important source of proteins and omega-3 fatty acids, which comprise the integral part of healthy diet. This work is about protein composition of fish meat. Fish meat contains about 16 – 22 % of proteins, which could distinguish three groups of proteins – sarcoplasmatic, myofibrillar and stromal. The main protein components are myofibrillar proteins, between which especially belong to actin and myosin. Methods, by which it can be analyzed proteins in meat, were based on different principles – electrophoretic, immunological, chromatographic, spectroscopic and mass spectrometry methods. In our work, it was used especially MALDI-TOF for the differentiation of raw meat of selected fish species.

Keywords: Fish species, fish meat proteins, analytical methods for determination of meat proteins, mass spectrometry, MALDI-TOF, PCA

Seznam zkratk

2-DE – 2-dimensional electrophoresis
DHB – 2,5-dihydroxybenzoic acid
DPA – Docosapentaenoic acid
ELISA – Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EPA – Eicosapentaenoic acid
HPLC – High-performance liquid chromatography
IEF – Isoelectrical focusation
LC-ESI-Q-TOF – Liquid chromatography – electron spray
ionization – quadrupole – time of flight

MALDI-TOF – Matrix assisted laser desorption/ionization – time of flight
MK – Mastné kyseliny
MS – Mass spectrometry
PCA – Principal component analysis
PCR – Polymerase chain reaction
SDS – Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE – Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis
TFA – Trifluoroacetic acid
UV-VIS – Ultraviolet–visible

URČENÍ ZVÍŘECÍHO PŮVODU ARCHEOLOGICKÝCH KOSTÍ

Alena Meledina, Tatiana Smirnova

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha; meledina@vscht.cz

Úvod

Metodika umožňující rozlišení zvířecího původu kostí a jejich fragmentů pocházejících z různých živočišných druhů má mnoho uplatnění, a to jak v oblasti archeologie a paleontologie, tak i v oblasti bezpečnosti potravin, forenzního zkoumání, anebo kontroly dodržování obchodních norem. V případě archeologie kosterní pozůstatky obratlovců (včetně malých savců, ptáků, plazů, obojživelníků a ryb) nebo jejich fragmenty představují nejhojnější organické zbytky na archeologických lokalitách. Určení zvířecího druhu, jemuž patří nalezený kostní vzorek, je důležité například pro pochopení postupů chovu v daném místě, odhalení klimatických podmínek v minulosti nebo pro zjištění dopadu člověka na životní prostředí v historických dobách.

Chemické složení kostí

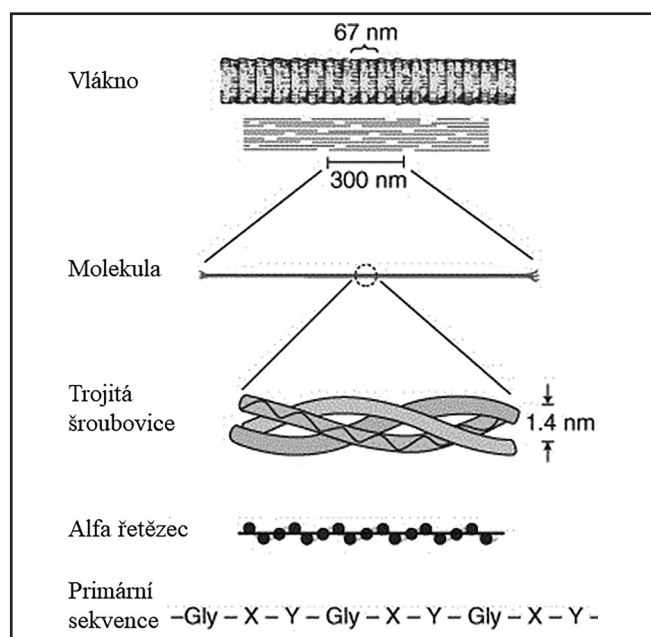
Anorganické minerální látky se vyskytují v kosti ve formě tyčinkovitých krystalů, které jsou uspořádány paralelně s osami kolagenových svazků¹. Vápník a fosfát jsou hlavní minerály kostní tkáně, vyskytující se jako fosforečnan a uhličitan vápenatý v přibližném poměru 8:1. Tyto látky tvoří krystaly hydroxyapatitu $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ a fosforečnanu vápenatého $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Dále se v kostech vyskytuje fluorid vápenatý, fosforečnan hořečnatý, síran strontnatý, chlorid sodný a ionty radia^{1,2}. Minerální složky jsou zodpovědné za tvrdost, tuhost a odolnost kostí vůči tlaku¹. Při nedostatku minerálů kost ztratí svou pevnost a stává se více flexibilní. Na druhou stranu při zvýšení množství anorganických látek lze pozorovat její větší křehkost¹.

Hlavními organickými složkami kostní tkáně jsou kolagen a amorfni glykoproteiny, které obsahují kyselinu chondroitinsírovou B. Amorfni glykoproteiny jsou přitom dispergované uvnitř a kolem svazků kolagenových vláken. Organický materiál tvoří přibližně 50 % objemu a 30 % suché hmotnosti mezibuněčné hmoty^{1,2}.

Kost obsahuje několik specifických glykoproteinů, jako sialoprotein nebo osteokalcin, které jsou odvozeny od kyseliny γ -karboxyglutamové. Tyto látky mají za úkol vázat vápník, z čehož vyplývá, že jejich přítomnost je jedním z nejdůležitějších faktorů pro kalcifikaci kostní tkáně³. V kostech se také nacházejí glykosaminoglykany (mukopolysacharidy) skládající z aminosacharidů a uronových kyselin⁴. Mezi ně patří například kyselina hyaluronová, heparinsulfát a chondroitinsulfát. Jejich hlavní úlohou je vázat velké množství vody a tím zaujímat značný prostor, díky čemuž vyplňují kost⁴. Sacharidové jednotky se spojují s kolagenem O-glykosidovou vazbou přes hydroxylysin⁴. Vlákná kolagenu v kostech mají vysokou elasticitu, malou pevnost v tlaku a značnou vnitřní pevnost v tahu². Při poklesu množství organických látek se kost stává křehkou, ale ta bude i nadále zachovávat svůj tvar³.

Kolagen

Kolagen je vláknitá bílkovina nacházející se skoro ve všech živých organismech (výjimkou jsou jednobuněčné mikroorganismy). Jedná se o nejhojněji zastoupený protein v živočišných tělech, který představuje 25 – 35 % celkového množství bílkovin. Kolagen tvoří hlavní složku kostí, kůže, pojivových tkání, cévních



Obr. 1: Struktura kolagenu od primární sekvence až po vlákno. Každý jednotlivý polypeptidový řetězec je zkroucen do levotočivé spirály se třemi zbytky Gly-X-Y (kolem 100 aminokyselin v pozici X je prolin a stejné množství aminokyselin v pozici Y je hydroxyprolin) na otáčku a všechny tyto řetězce jsou pak navinuty do pravotočivé superhelixu^{4,7,8}.

stěn a zubů, a umožňuje jejich správnou funkci, hlavně v souvislosti s jejich mechanickými vlastnostmi^{4,5}.

Kolagen lze zařadit do skupiny extracelulárních fibrilárních bílkovin neboli skleroproteinů. Jeho charakteristickou vlastností je vysoký obsah glycinu (Gly), prolinu (Pro) a hydroxyprolinu (HyPro). Poslední aminokyselina je typickou složkou tohoto proteinu a vzniká modifikací prolinu za přítomnosti kyseliny askorbové⁵.

Primární struktura kolagenu je tvořena pravidelným opakováním motivu -Gly-Pro-HyPro- (obr. 1)⁴. V proteinu lze rozlišit polární a apolární oblasti. První obsahují velký počet vysokomolekulárních polárních aminokyselin (Asp, Glu, Lys, Arg). Tyto aminokyseliny nemají v řetězci přesnou orientaci, díky čemuž polární oblasti jsou považovány za reaktivní části kolagenové molekuly. Apolární části poskládané z již zmíněného motivu Gly-Pro-HyPro jsou naopak vysoce orientované, což má za následek sníženou reaktivitu⁵. Mezi důležité vlastnosti kolagenních vláken patří jejich vysoká pevnost v tahu, která je dána unikátní trojřetězcovou šroubovicovou strukturou⁵. Samotná trojitá šroubovice a tři polypeptidy (obr. 1) ji tvořící, jsou stočeny v opačných směrech⁵.

Tropokolagen je hlavní strukturální jednotkou, která se skládá ze třech vláken (α -řetězců) obsahujících kolem 1000 zbytků aminokyselin. Prolin spolu s hydroxyprolinem ovlivňuje helikální uspořádání kolagenu. Jednotlivá vlákna díky těmto dvěma aminokyselinám jsou stočená do levotočivé šroubovice. Zbytky glycinu jsou uvnitř trojité struktury a umožňují těsné uspořádání tří vláken u sebe, což vede ke vzniku superhelixu. Tropokolagen má tvar pravotočivé šroubovice (superhelixu) s délkou kolem 300 nm a průměrem 1,5 nm. Stabi-

lizaci superhelixu zajišťují vodíkové vazby mezi jednotlivými polypeptidovými řetězci. Tyto strukturní jednotky se řadí lineárně s posunem přibližně o $\frac{1}{4}$ délky, a tak vznikají kolagenová vlákna. Uvnitř a mezi tropokolagenovými jednotkami se nacházejí zpevňující kovalentní vazby. Za jejich tvorbu jsou odpovědní postranní řetězce lysinu^{4,5}. Jak již bylo zmíněno výše na jednotlivé hydroxylisínové zbytky jsou vázány sacharidové jednotky (galaktosa a glukosylgalaktosa). Množství těchto monomera disacharidů se liší u různých druhů kolagenů⁶.

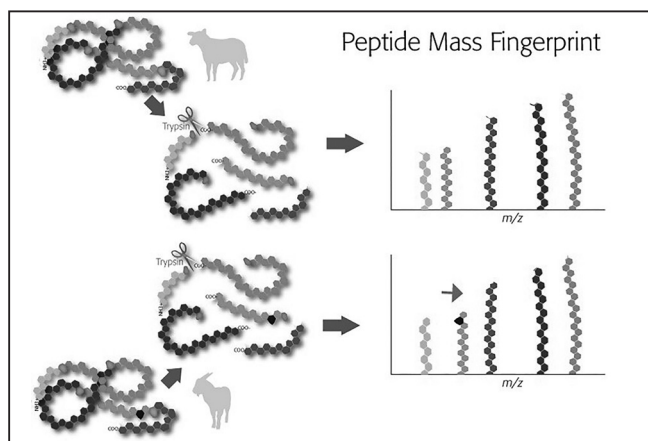
Kolagen nelze rozpustit ani ve vodě, ani ve zředěných roztocích solí. Jeho nerozpustnost roste během stárnutí, což vede k tomu, že kolagenová vlákna je možné rozpustit jen v silně hydrolytickém prostředí. Tento jev je následkem vzniku intermolekulárních a intramolekulárních příčných vazeb mezi molekulami tropokolagenu. Při tom se vytvoří kontinuální polymerní síť. Aminokyselinové zbytky lysinu a hydroxylisinu jsou zodpovědné za tvorbu příčných vazeb. Tyto aminokyseliny se částečně oxidují pomocí enzymu lisyloxydasy (protein-L-lysin:kyslík-6-oxidoreduktasa, EC 1.4.3.13) při katalytickém působení stopových množství měďnatých iontů, kdy vytvářejí aldehydicke skupiny⁶.

Metody zjišťování živočišného původu kostí

Jedna z nejznámějších metod sloužících pro identifikaci živočišného druhu je přístup založený na identifikaci DNA. Tímto přístupem se nejprve pomocí PCR s využitím druhově specifických primerů amplifikuje mitochondriální DNA ze vzorku. Vzniklé DNA produkty se vizualizují v agarosovém gelu po elektroforetickému rozdělení a porovnávají se s markerem, což je směs genů vybraných zvířecích druhů⁹. Metoda má vysokou taxonomickou specifičnost pro identifikaci zvířecího druhu, proto např. rozdíly v sekvencích DNA poskytují jednoznačnou metodu pro určení kozích kostí^{10,11}. Avšak metody založené na DNA mají svá omezení, protože tyto molekuly jsou poměrně nestabilní a mohou být degradovány vlivem různých faktorů (např. vysokou teplotou, chemickými látkami) a vlivem času^{12,13}. Zároveň může dojít ke kontaminaci vzorků z alternativních zdrojů domácí zvířecí DNA včetně živočišného odpadu¹⁴ a laboratorními čidly¹⁵.

Proteiny představují slibný prostředek pro identifikaci živočišného původu kostí nebo jejich fragmentů. Kolageny (zejména kolagen typu I) jsou dominantními proteiny v kostře obratlovců, které přetrvávají s mimořádnou dlouhověkostí v kostní tkáni. Jejich vlákna zachovávají svou strukturu a vlastnosti i pod vlivem vysoké teploty, vlhkosti, času a dalších vnějších podmínek. Detekce kolagenu ve vzorcích a jeho rozlišení od jiných typů bílkovin může být provedeno například na základě vysokého obsahu glycinu a 4-hydroxyprolinu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC), plynové chromatografie s hmotnostním spektrometrem (GC-MS)¹⁶ nebo elektroforeticky po kyselé hydrolyze¹⁷. Tyto metody jsou však nevhodné pro identifikaci živočišného zdroje kolagenu kvůli ztrátě specifičnosti druhů, která je uložena v aminokyselinové sekvenci.

Některé studie uvádějí přístup založený na imunologické reaktivitě pomocí metody ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)^{18,19}. Metoda je založena na interakci protilátek značených enzymy (nejčastěji se používá sekundární protilátka značená alkalickou fosfatase) s antigeny, které jsou zakotveny na pevném nosiči. ELISA je selektivní a citlivá metoda detekce¹⁹, avšak poměrně často nastává křížová reakce protilátek, a to



Obr. 2: Princip metody Peptid Mass Fingerprint. Zvířecí druhy mohou být rozlišeny na základě rozdílu v hmotnosti peptidu způsobeného substitucí aminokyselin.²⁵

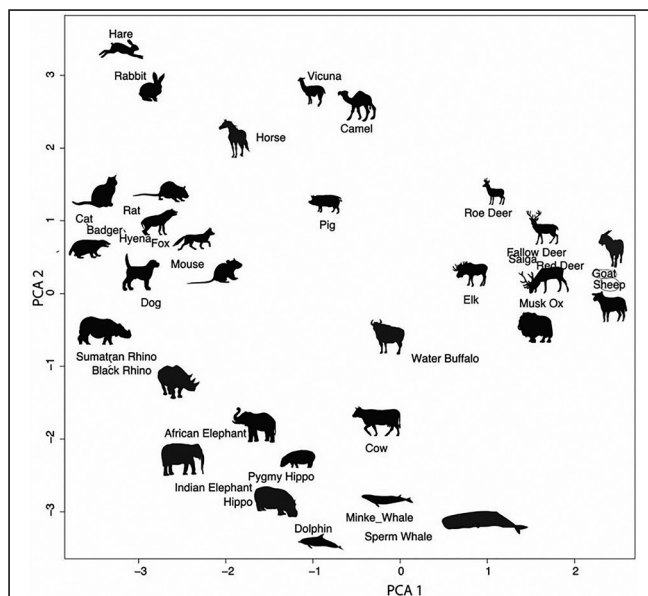
z důvodu vysoké podobnosti aminokyselinových sekvencí kolagenů zejména u savců.

V poslední době častěji se využívá pro identifikaci živočišného původu kolagenu hmotnostní spektrometrie²⁰⁻²³, která umožňuje změřit hmotnost peptidových molekul a identifikovat přítomné aminokyseliny. Na základě technik hmotnostní spektrometrie byla vytvořena metoda peptidového mapování tzv. Peptid Mass Fingerprint (obr. 2), která se skládá z následných kroků:

- 1) specifické štěpení proteinu pomocí enzymu,
- 2) separace vzniklých peptidů,
- 3) jejich detekce.

Během této metody vznikají pro daný protein specifické peptidové fragmenty, které se následně porovnávají s databází, ze které lze zjistit, o který protein se jedná. Na základě získaných informací lze vytvořit peptidovou mapu (tzv. otisk prstu), která je charakteristická pro daný protein²⁴.

V případě určování zvířecího původu kosti se tento přístup nazývá ZooMS (Zooarchaeology by Mass Spectrometry), kdy se využívají peptidy (markery) z dominantního proteinu kosti kolagenu typu I, který je známý svou dlouhou životností^{21,25}. Metoda vyžaduje malá množství vzorku (4 – 10 mg kosti) a umožňuje identi-



Obr. 3: Analýza hlavních komponent hmotnostních spekter z MALDI-TOF MS ukazuje dobré rozlišení mezi savci, přestože kolagen typu I je relativně velmi konzervativním proteinem²⁵.

fikaci živočišných druhů z fragmentů kostí, tavené masové a kostní moučky nebo archeologických kostních vzorků. Zjistit druhový původ těchto materiálů jinou metodou je obtížné až téměř nemožné, protože již neexistují jasné morfologické znaky kostí a mnohdy není zachována ani DNA.

Na začátku analýzy jsou vzorky štěpeny trypsinem a peptidy se frakcionují pomocí reverzní fáze C18. Pak následuje měření pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization -Time of Flight). Takto byl identifikován kolagen z 32 různých druhů savců (obr. 3) a bylo zjištěno celkem 92 peptidových markerů, které byly použity k určení zvířecích kostí pocházejících z neolitu²¹.

Mechanismus přežití kolagenu v archeologických kostech je neobvyklý a pozoruhodný. Kolagenové fibrily chrání před degradací minerální „plášť“, který je umístěn na jejich povrchu²⁶. To vede k tomu, že protein je odolný jak vůči vysokým teplotám, tak i vůči dlouhodobému působení času. Je předpokládáno, že u star-

ších kosterních pozůstatků lze snadněji získat kolagenový otisk prstu, protože v průběhu času se degradují další proteiny (například hemoglobin a osteokalcin) rychleji²⁵. Díky tomu byly kolageny nalezeny ve vzorcích kostní tkáně dinosaurů, např. u *Tyrannosaurus rex*, *Brachylophosaurus canadensis* a dalších již neexistujících druhů^{27,28}. Paleoproteomika má nejen významný příslib pro objasnění evolučních vztahů mezi vyhynulými a existujícími organismy, ale je potenciálně užitečná pro zlepšení našeho chápání funkce bílkovin u současně žijících zvířat²⁸.

Technika hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF umožňuje určit původ kostí a kostních fragmentů, i když vzorky mohou být příliš staré nebo degradované. Dominantní proteiny kosti – kolageny – jsou odolné vůči drastickým okolním podmínkám a vlivu času. To dělá tyto bílkoviny klíčem k nalezení odpovědi, jaké zvíře zanechalo nalezený archeologický kostní materiál.

Literatura:

1. <https://www.britannica.com/science/bone-anatomy>, staženo 5. října 2019.
2. Knoz J: Obecná zoologie I. Taxonomie, látkové složení, cytologie a histologie. Státní pedagogické nakladatelství, Praha 1979
3. Junqueira CL, Carneiro J, Kelley R: Základy histologie. H & H, Jinočany 1997
4. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, et al.: Harperova biochemie. H & H, Jinočany 2002
5. Peterková P, Lapčík L: *Chem. Listy*, 94 (2000)
6. https://is.muni.cz/do/1451/e-learning/kineziologie/elportal/pages/zakladni_slozky.html, staženo 1. února 2020.
7. Eyre DR: *Science*, 207, 4437 (1980)
8. <https://basicmedicalkey.com/the-extracellular-matrix-3/>, staženo 9. února 2020.
9. Albertini E, Raggi L, Vagnini M et al.: *Anal. Bioanal. Chem.* 399, 2987 (2011)
10. Bar-Gal GK, Ducos P, Horwitz LK: *Int. J. Osteoarchaeol.* 13, 120 (2003)
11. Loreille O, Vigne JD, Hardy C, et al.: *Int. J. Osteoarchaeol.* 24, 33 (1997)
12. Willerslev E, Cooper A: *Proc. R. Soc. London, Ser. B* 272, 3 (2005)
13. Kumazawa Y, Taga Y, Takashima M, et al.: *Herit. Sci.* 6, 43 (2018)
14. Haile J, Holdaway R, Oliver K, et al.: *Mol. Biol. Evol.* 24, 982 (2007)
15. Leonard JA, Shanks O, Hofreiter M, et al.: *J. Archaeol. Sci.* 34, 1361 (2007)
16. Příkrýl P, Havlíčková L, Pacáková V, et al.: *J. Sep. Sci.* 29, 2653 (2006)
17. Kaml I, Vcelakova K, Kenndler E: *J. Sep. Sci.* 23, 161 (2004)
18. Lowenstein JM, Reuther JD, Hood DG, et al.: *Forensic Sci. Int.* 159, 182 (2006)
19. Cartechini L, Vagnini M, Palmieri M, et al.: *Acc. Chem. Res.* 43, 867 (2010)
20. Buckley M: *PLoS ONE* 8, (2013)
21. Buckley M, Collins M, Thomas-Oates J, et al.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23, 3843 (2009)
22. Fremout W, Kuckova S, Chova M, et al.: *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* 25, 1631 (2011)
23. Romero-Pastor J., Navas N., Kuckova S., et al.: *J. Mass Spectrom.* 47, 322 (2012)
24. Vaňková H: *Chem. Listy*. 93 (1999)
25. Collins M, Buckley M, Grundy HH, et al.: *Spectroscopy Europe* 22, 6 (2010)
26. Covington AD, Song L, Suparno O, et al.: "Link-lock: *J. Soc. Leather Technol. Chem.* 92(1), 1 (2008)
27. Schweitzer MH, Schroeter ER, Cleland TP, et al.: *Proteomics and systems biology*. 19 (16), (2019)
28. San Antonio JD, Schweitzer MH, Kalluri R, et al.: *PLOS One*. 6 (6), (2011)

Souhrn

Meledina A., Smirnova T.: Určení zvířecího původu archeologických kostí

Určení živočišného původu kostního vzorku je důležitá pro pochopení postupů v chovu např. hospodářských zvířat v určité lokalitě, pro objasnění evolučních vztahů nebo pro zjištění lidské činnosti v dané historické době. V současné době se k tomu velmi úspěšně používá proteomický přístup založený na hmotnostní spektrometrii. Jeho základem je analýza kolagenu, který je nejrozšířenějším kostním proteinem. Tato bílkovina je známa svou významnou odolností vůči nepříznivým vlivům prostředí a degradaci, díky čemuž lze ji najít i ve velmi starých kosterních pozůstatcích. Tento přístup má potenciálně uplatnění nejen v oblasti archeologie a paleontologie, ale také i v oblasti bezpečnosti potravin, forenzního zkoumání, anebo kontroly dodržování obchodních norem.

Klíčová slova: archeologické kosti, kolageny, proteomická analýza

Summary

Meledina A., Smirnova T.: Determination of animal origin of archaeological bones

Determination of the animal origin of a bone sample is important for understanding breeding practices in a particular area, for clarifying evolutionary relationships, or for identifying human activity at a given historical time. At present, a proteomic approach based on mass spectrometry has been used very successfully. It is based on the analysis of collagen, which is the most common bone protein. This protein is known for its significant resistance to environmental influences and degradation, thanks to which it can be found even in very old skeletal remains. This approach has potential application in the field of archaeology and palaeontology, but also in the field of food safety, forensic research, or control of compliance with industry standards.

Keywords: archaeological bones, collagens, proteomic analysis

OBSAH

Úvodem	37
Viskin A., Smirnova T.: Metody diagnostiky alzheimerovy choroby	38
Zubová A., Novotný O., Souček F.: Proteomické rozlišení různých druhů rybího masa	41
Meledina A., Smirnova T.: Určení zvířecího původu archeologických kostí	45

CONTENT

Editorial	37
Viskin A., Smirnova T.: Diagnostics methods of alzheimer disease	38
Zubová A., Novotný O., Souček F.: Proteomic differentiation of varied species of fish meat	41
Meledina A., Smirnova T.: Determination of animal origin of archaeological bones	45

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).