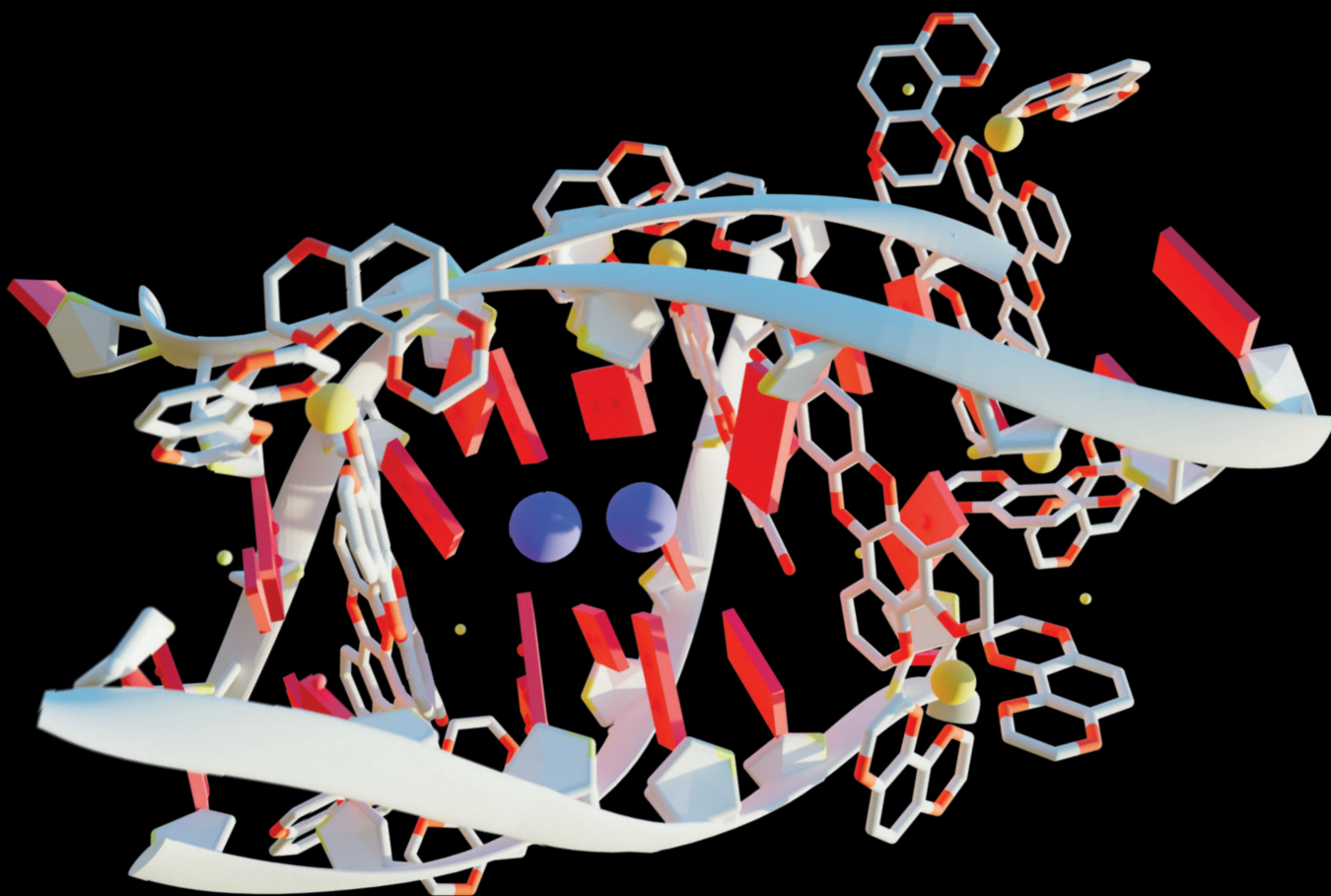


Chemické Listy

3

ročník • 118



Bioortogonální reakce

Tau protein

Identifikace buněčných cílů

Branná výchova ve výuce





MESSE
MÜNCHEN

What will be possible in the laboratory of the future.

Lab trends, innovations & know-how

Svět laboratoří se rychle rozvíjí – a na veletrhu analytica budete v centru tohoto pokroku. Přední světový veletrh pro laboratoře, technologie, analýzy a biotechnologie nabízí kompletní přehled trhu na výstavní ploše 55 000 m². Seznamte se s lídry trhu a odborníky, objevte svět novinek a najděte optimální řešení pro vaše potřeby!



analytica

we create lab

duben 9.–12. 2024

[analytica.de](https://www.analytica.de)

Metrohm demonstrační laboratoř na Univerzitě Karlově





Pražská makromolekulární setkání

Již několik desetiletí se vždy počátkem léta konají na pražském Ústavu makromolekulární chemie, v.v.i. (ÚMCH), takzvaná Prague Meetings on Macromolecules (PMM), což obnáší jednu nebo dvě na sebe navazující mezinárodní týdenní konference zaměřené (poměrně úzce) na určitou konkrétní problematiku polymerní vědy. Letošní týden na ÚMCH s titulem The Polymers for Sustainable Future bude kombinací dvou tradičních vědeckých setkání: pod hlavičkou PMM jako v pořadí již 85. konference a zároveň jako 11. setkání skupiny Green Chemistry and Nanotechnologies in Polymeric Materials (GCNPM). Letošní akce proběhne v termínu 24. až 28. června.

PMM nejsou jediným typem mezinárodních vědeckých setkání konaných v Praze a zaměřených na makromolekuly. Konala se zde i tři velká symposia pod hlavičkou IUPAC, konkrétně v letech 1957, 1965 a 1992. Kromě toho se brzy začala prosazovat menší setkání, z nichž první – zpočátku pod názvem Microsymposium – se odehrálo v roce 1967, a od té doby tedy již čtyřiaosmdesátkrát, někdy pod titulem Discussion Conference (první v roce 1970), nyní jako PMM.

Domnívám se, že upozornit v úvodníku Chemických listů případné zájemce na tuto akci není zbytečné, i když se ji organizátoři PMM jistě snažili propagovat obvyklými cestami. Účast na ní je určitě vhodná pro všechny odborníky, které zajímá vztah mezi polymerními materiály a životním prostředím. Další informace včetně pokynů pro registraci lze nalézt na <https://www.imc.cas.cz/sympo/85pmm/>.

Představím zde některá z témat, která budou předmětem zmíněné konference. Pro ilustraci bude pro každé z nich uveden vždy jeden odkaz (či dva) na přehledný článek z poslední doby, který jsem našel a který se dotýká tématu týká:

- Polymery, připravené z obnovitelných zdrojů, tzv. biobased^{1,2}. Ty je třeba odlišit od bioplastů, jejichž původem je biomasa, anebo které jsou biodegradabilní.
- Degradace polymerů v prostředí^{3,4}. Z praktického hlediska je to dichotomický problém: na jedné straně můžeme usilovat o plasty co nejodolnější proti vnějším vlivům, na straně druhé naopak o takové makromolekuly, které se v přírodě rozloží co nejrychleji.

- Recyklace a upcyclace polymerů⁵. Méně známý termín upcyclace znamená, že doslouživší polymerní produkt je zpracován/upraven tak, aby se jeho užitná hodnota – oproti původní – zvýšila.
- Technologie výroby udržitelných polymerů. Udržitelné polymery – podivná čeština, podřízená anglickému sustainable polymers – to jsou materiály odvozené od obnovitelných, recyklovaných a odpadních zdrojů uhlíku⁶.
- Enzymové reakce v makromolekulární chemii. To jsou in vitro polymerizace syntetických monomerů katalyzované izolovaným enzymem⁷.
- Polymerizace přátelské k životnímu prostředí. Biokompatibilní monomery typu kyseliny mléčné sice poskytují biodegradabilní polymery, ty ale obsahují stopy karcinogenních katalyzátorů. Hledají se proto cesty bezkatalyzátorových polymerizací⁸.
- Fixace oxidu uhličitého do polymerních materiálů⁹. Autor tohoto úvodníku uvítá, pokud se najdou chemici, pro které budou tato témata natolik přitažlivá, že se zaregistrují a vypraví do ÚMCH vyslechnout vybrané přednášky nebo prohlédnout postery. A to i tací, jejichž odborné zaměření je zcela odlišné.

Jiří Podešva

LITERATURA

1. Babu R. P., O'Connor K., Seeram R.: Prog. Biomater. 2, 8 (2013).
2. Cywar R. M., Rorrer N. A., Hoyt C. B., Beckham G. T., Chen E. Y.-X.: Nat. Rev. Mater. 7, 83 (2022).
3. Kliem S., Kreutzbruck M., Bonten C.: Materials 13, 4586 (2020).
4. Holická M., Vysloužil J., Kubová K., Muselík J., Vetchý D.: Chem. Listy 113, 364 (2019).
5. Hamad K., Kaseem M., Deri F.: Polym. Degrad. Stab. 98, 2801 (2013).
6. Mohanty A. K., Wu F., Mincheva R., Hakkarainen M., Raquez J.-M., Mielewski D. F., Narayan R., Netravali A. N., Misra M.: Nat. Rev. Methods Primers 2, 46 (2022).
7. Matyjaszewski K., Möller M. (ed.): Polymer Science: A Comprehensive Reference. Elsevier 2012.
8. Dubey S. P., Thakur V. K., Krishnaswamy S., Abhyankar H. A., Marchante V., Brighton J. L.: Vacuum 146, 655 (2017).
9. Kamphuis A. J., Picchioni F., Pescarmona P. P.: Green Chem. 21, 406 (2019).



Užití tohoto díla se řídí mezinárodní licencí Creative Commons Attribution License 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.cs>), která umožňuje neomezené využití, distribuci a kopírování díla pomocí jakéhokoliv média, za podmínky řádného uvedení názvu díla, autorů, zdroje a licence.

VÝVOJ A POUŽITÍ BIOORTOGONÁLNÍCH REAKCÍ PRO ZOBRAZOVÁNÍ A AKTIVACI LÉČIV

Článek je věnován 70. výročí založení Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR v Praze.

MILAN VRÁBEL a VERONIKA ŠLACHTOVÁ

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6, Česká republika
vrabel@uochb.cas.cz

Došlo 26.10.23, přijato 3.1.24.

Chemické transformace kompatibilní s biologickými systémy slouží jako neocenitelné nástroje pro zkoumání biomolekul, sloučenin léčiv a biologických procesů v jejich přirozeném prostředí. Složitě prostředí živých organismů vyžaduje, aby tyto reakce byly vysoce selektivní a účinné, což představuje pro oblast organické chemie obrovskou výzvu. V poslední době se objevila řada chemických reakcí, které tyto podmínky splňují, a poskytují proto výzkumným pracovníkům rozmanitou sadu nástrojů. Tento rukopis představuje komplexní přehled současných bioortogonálních reakcí s důrazem na jejich aplikace v zobrazování, diagnostice a medicíně.

Klíčová slova: click chemie, bioortogonální reakce, zobrazování, fluorescenční značení, proléčiva

Obsah

1. Úvod
2. Z historie bioortogonálních reakcí
3. Využití bioortogonálních reakcí v zobrazování
4. Využití bioortogonálních reakcí pro aktivaci léčiv
5. Vývoj nových bioortogonálních reakcí
6. Závěr

1. Úvod

Bioortogonální reakce, charakteristické svou schopností probíhat selektivně v komplexním prostředí živých systémů, otevřely nové možnosti pro manipulaci a studium biomolekul. Tato dynamicky se rozvíjející oblast moderní chemie má hluboký dopad na různá odvětví a přispívá k vývoji pokročilých zobrazovacích sond, inovativních diagnostických nástrojů a nových terapeutik. Udělení Nobelovy ceny za chemii v roce 2022 Carolyn Bertozziové, Mortenu Meldalovi a Barrymu Sharplessovi „za vývoj click chemie a bioortogonální chemie“ potvrzuje obrovský potenciál tohoto odvětví. Vývoj bioortogonálních reakcí je komplexní proces, přičemž nejdůležitější roli v něm sehrávají samotné reagenty, které se reakce účastní. Tyto musí být ne jenom dostatečně reaktivní, ale i dostatečně stabilní a selektivní vůči druhé funkční skupině. Navíc tyto reagenty nesmí být toxické za podmínek použití, a hlavně vůči organismu, ve kterém se používají. Všechny tyto podmínky dělají z vývoje bioortogonálních reakcí a činidel náročný proces, který však může vést k novým nástrojům pro širokou škálu aplikací.

Cílem tohoto přehledového článku je představit současné poznatky o bioortogonálních reakcích a jejich použití zejména při zobrazování, diagnostice a v medicíně.

2. Z historie bioortogonálních reakcí

Bioortogonální reakce jsou chemické reakce známé z učebnic organické chemie. Nicméně ne všechny reakce v učebnicích organické chemie jsou bioortogonální. Jako bioortogonální se definuje chemická reakce, která neinteraguje ani nezasahuje do biologického systému, tudíž je s biologickými systémy kompatibilní¹. Za vůbec první bioortogonální reakci se považuje tzv. Staudingerova ligace, vyvinutá a popsána v roce 2000 (cit.²), která byla použita pro značení azidem modifikovaných cukerných molekul na povrchu živých buněk pomocí fosfinových derivátů obsahujících elektrofilní past (Schéma 1).

Dalším důležitým milníkem vývoje reakcí použitelných na biologických systémech bylo zavedení pojmu „click chemie“ Barry Sharplessem v roce 2001 (cit.³). Jako click reakce se označují reakce, které jsou snadné na provedení, probíhají v různých rozpouštědlech (včetně vody) bez zásadního vlivu dalších faktorů (jako např. pH), generují minimální a neškodné vedlejší produkty a vyznačují se vysokou termodynamickou hnačí silou, která je rychle a nevratně pohání k tvorbě produktů ve vysokém výtěžku, s vysokou reakční rychlostí a specificitou (v některých případech s regio- i stereo-specificitou). Za nejznámější click reakci lze považovat mědi katalyzovanou azido-alkynovou cykloadici (z angl. copper-catalyzed azide

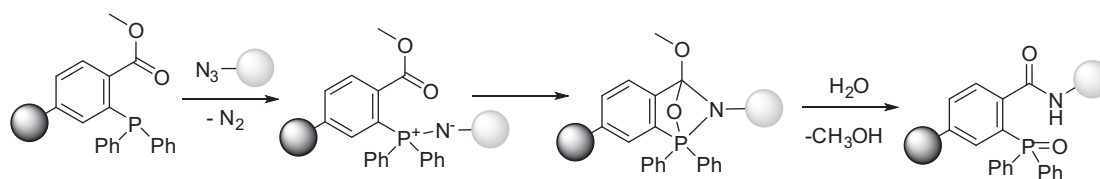


Schéma 1. Staudingerova ligace

alkyne cycloaddition, CuAAC, Schéma 2a)^{4,5}. CuAAC nachází využití v různých oblastech, jako jsou modifikace biomolekul, materiálová nebo medicínská chemie^{6–8}. Nicméně, bioortogonalita této reakce je kompromitována toxicitou měďných solí, které se při reakci využívají jako katalyzátor⁹. Tudiž ne každá click reakce je bioortogonální. Přes různé snahy kontrolovat toxicitu Cu^I iontů, např. použitím vhodných komplexujících ligandů¹⁰, zůstává použití této reakce na živých systémech omezené¹¹.

Možným řešením tohoto problému se ukázalo být použití pnutí kruhu jako hnací síly reakce alkyňů s azidy místo katalýzy. Konkrétně se jedná o reakci cykloalkynů s azidy, při které dochází k uvolnění napětí cykloalkynového kruhu za vzniku triazolového produktu jako směsi dvou regioisomerů¹². Tato reakce je známá jako „strain-promoted azide-alkyne cycloaddition“ (SPAAC, Schéma 2b) a patří mezi nejpoužívanější bioortogonální reakce vůbec. Obměnou struktury cykloalkynů lze modulovat

rychlost reakce a další vlastnosti těchto sloučenin, jako jsou rozpustnost, lipofilicita nebo stabilita^{13,14}.

Využití principu uvolnění pnutí molekul při reakci dnes patří mezi nejčastěji využívané způsoby navýšení reaktivity bioortogonálních činidel. Důvodem potřeby vysokých reakčních rychlostí je používání bioortogonálních činidel, resp. provádění těchto reakcí v živých systémech za nízkých koncentrací (důležitou roli zde hraje toxicita látek ale i rozpustnost některých sloučenin). Proto je potřeba mít reakci s dostatečnou hnací silou. Mezi nejpoužívanější bioortogonální reakce dnes patří reakce 1,2,4,5-tetrazinů (Tz) s napjatými systémy, jako jsou cykloalkyny a obzvláště pak *trans*-cykloalkyny (TCO) (Schéma 3)^{15,16}.

Rychlostní konstanty této Dielskovy-Alderovy reakce s inverzními elektronovými nároky mohou ve vodném prostředí dosahovat hodnot enzymatických reakcí a jsou v řádech stovek tisíc až milionů M⁻¹ s⁻¹ (cit.^{17,18}). Tato

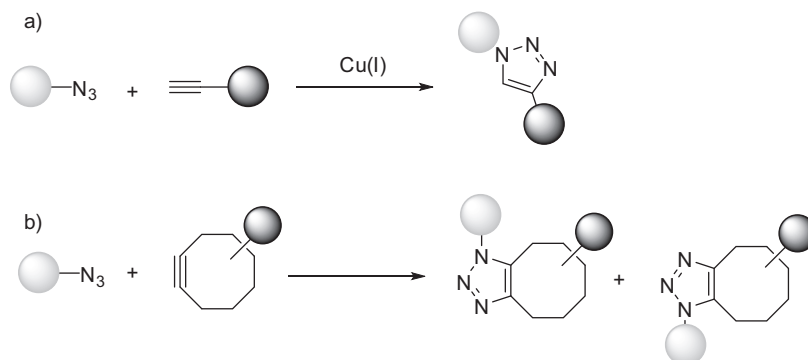
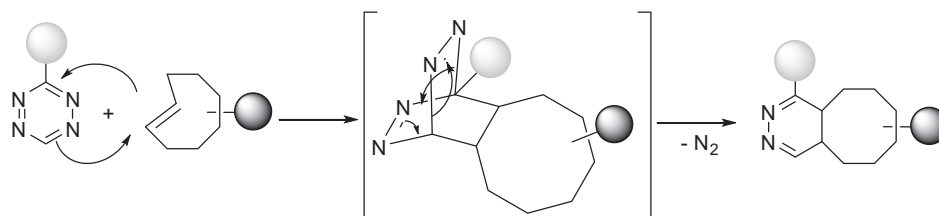


Schéma 2. a) Měď katalyzovaná cykloadice alkyňů a azidů (CuAAC); b) Cykloadice podporovaná deformací kruhu (SPAAC)

Schéma 3. Dielskovy-Alderova reakce s inverzními elektronovými nároky (IEDDA) 1,2,4,5-tetrazinů s *trans*-cykloalkyny vedoucí k dihydropyridazinům

výjimečná reaktivita spojená s malou toxicitou derivátů Tz a TCO pak umožňuje použití reakce v živých organismech včetně prvních klinických studií na lidech^{19–21}. Mezi nejčastější oblasti použití patří zobrazování a medicína.

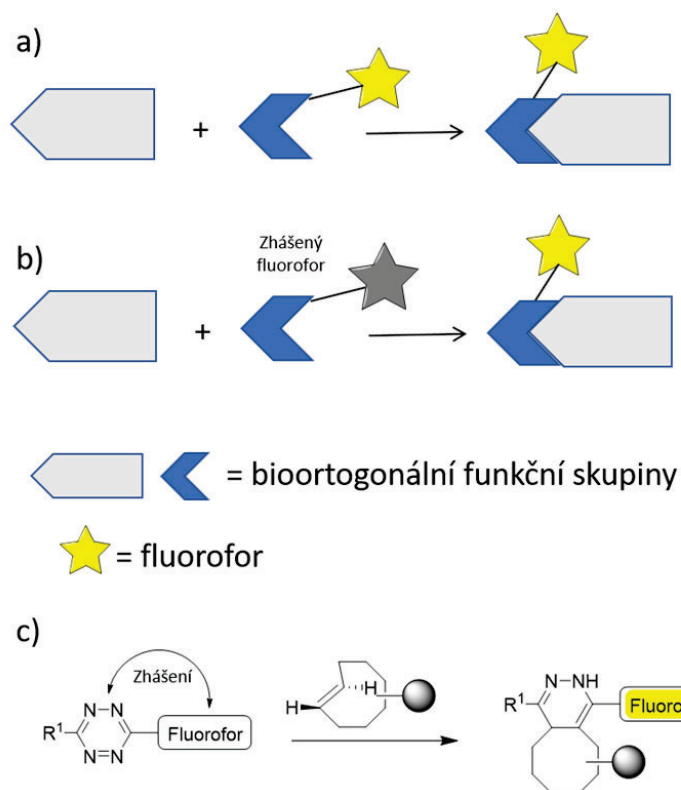
3. Využití bioortogonálních reakcí v zobrazování

Vizualizace biomolekul a biologických procesů v prostředí živých organismů je nedílnou součástí studia biologických systémů^{22,23}. Bioortogonální reakce umožňují značení biomolekul v jejich přirozeném prostředí^{24,25}. Tyto reakce umožňují vědcům zkoumat, zachycovat a pochopit molekulární interakce s nebývalou přesností. Od zavedení fluorescenčních značek až po vývoj různých zobrazovacích sond, bioortogonální chemie poskytuje výzkumníkům rozsáhlou sadu nástrojů, které jim umožňují lépe studovat a porozumět interakcím a procesům probíhajícím v živých organismech.

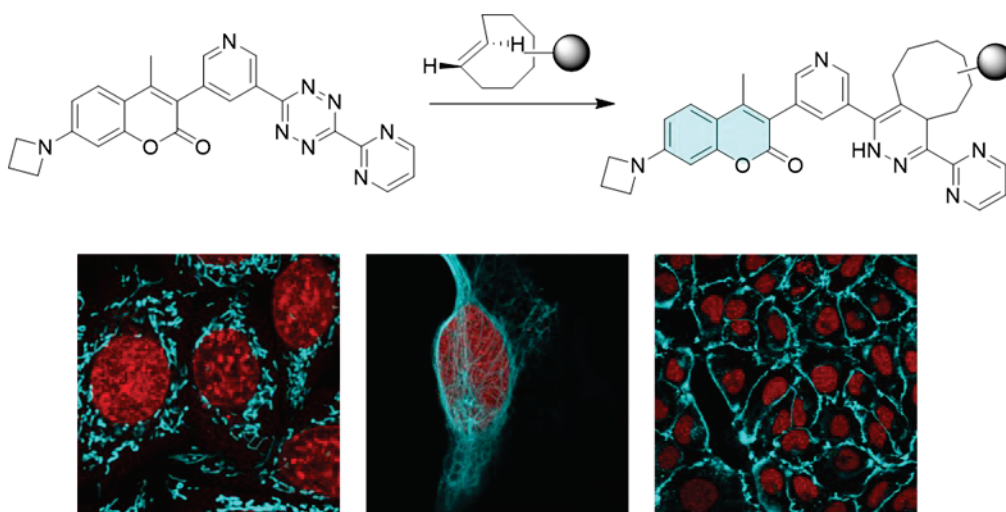
Nejběžnější způsob použití bioortogonálních reakcí při vizualizaci biomolekul je založen na připojení fluorescenční značky k biomolekule, která je předmětem studie a obsahuje druhou bioortogonální funkční skupinu²⁶. Zavedením jedné bioortogonální funkční skupiny do struktury biomolekuly, např. ve formě modifikované aminoky-

seliny, lze dosáhnout vysoké selektivity fluorescenčního značení (obr. 1a)²⁷.

Navíc, pokud buňka dokáže sama vyprodukovat takto upravenou biomolekulu, lze bioortogonální značení provádět přímo v živých buňkách přidáním druhé bioortogonální sloučeniny nesoucí fluorescenční značku. Tento způsob značení často vyžaduje zdlouhavou optimalizaci celého procesu. Problém spočívá zejména v potřebě odmytí přebytečné barvičky (druhého reagentu), aby se dosáhlo vysokého poměru signálu k šumu. Elegantní řešení tohoto problému nabízí tzv. fluorogenní reakce²⁸. Při těchto reakcích dochází k tvorbě fluorescenční značky až v průběhu reakce. To znamená, že ze dvou reagentů, které nejsou fluorescenční, vzniká fluorescenční produkt jejich vzájemnou reakcí (obr. 1b). Tímto odpadá potřeba odmytí nadbytečných reagentů, protože ty nejsou fluorescenční, a nezpůsobují navýšení signálu pozadí. Jako příklad fluorogenní reakce lze uvést reakci tetrazinů modifikovaných fluorescenční značkou s dienofily, jako jsou bicyklononyn (BCN) nebo TCO²⁶. Princip této fluorogenní reakce je založen na schopnosti tetrazinů zhasět fluorescence některých fluoroforů (obr. 1c)²⁹. Jejich reakcí s BCN nebo TCO pak dochází ke vzniku pyridazinů nebo dihydropyridazinů, které už tuto zhasěcí schopnost nemají³⁰. Následkem je obnova fluorescence neboli rozsvícení připojeného fluoro-



Obr. 1. a) Fluorescenční značení bioortogonální reakcí; b) Fluorogenní verze reakce; c) Příklad fluorogenní reakce 1,2,4,5-tetrazinů



Obr. 2. Fluorogenní reakce tetrazin-kumarinů a příklad použití na živých buňkách

foru. Příkladem je reakce tetrazinů modifikovaných kumarinem, kterou lze použít k efektivnímu značení živých buněk (obr. 2).

Výše uvedený způsob fluorogenních reakcí využívá schopnost některých bioortogonálních činidel sloužit jako zhasič fluorescence. Jako jiný příklad fluorogenních reakcí lze uvést reakce, při kterých dochází ke vzniku fluoroforů *de novo*. Příkladem je reakce nitriliminů s nenasycenými dipolarofily³¹. Při této reakci dochází ke vzniku fluorescenčních pyrazolinů nebo pyrazolů³². V kombinaci s možností generování nitriliminů fotochemickým rozpadem tetrazolů tato reakce umožňuje sledovat, kde a kdy k modifikaci dojde³³.

Mezi jiné reakce tohoto typu patří reakce TCO nebo BCN s tetraziny nesoucími různé substituenty, zejména pak elektrondonorní skupiny³⁴. Při této reakci dochází ke vzniku dihydropyridazinů nebo aromatických pyridazinů, které jsou fluorescenční³⁵. Vhodnou substitucí tetrazinu pak lze modulovat fluorescenci vzniklých derivátů v široké škále barev³⁶. Tato reakce byla úspěšně použita např. při zobrazení biologicky aktivních látek, jako např. paklitaxel, v živých buňkách.

Mezi nejpokročilejší a také nejslibnější způsoby využití bioortogonálních reakcí v zobrazování patří využití v biomedicíně^{19,23}. Tento způsob použití se dnes běžně testuje na modelových zvířatech. Konkrétně se jedná o reakce umožňující použití např. v jednofotonové emisní výpočetní tomografii (z angl. Single-Photon Emission Computed Tomography, SPECT) nebo v pozitronové emisní tomografii (z angl. Positron Emission Tomography, PET). Tento typ využití nachází uplatnění nejen v diagnostice, ale i medicíně.

4. Využití bioortogonálních reakcí pro aktivaci léčiv

Velkou část bioortogonálních reakcí lze charakterizovat jako reakce konjugační, tj. reakce, při kterých dochází ke spojení dvou komponent, mezi kterými vzniká nová chemická (zpravidla kovalentní) vazba. Druhou velkou skupinu bioortogonálních reakcí tvoří reakce štěpné, při kterých dochází k rozpojení vazeb³⁷. K rozpojení nicméně většinou dochází až po počátečním konjugačním kroku, který také slouží jako impuls pro následné rozpojení. Mezi tento druh bioortogonálních reakcí patří reakce iminosydonů s cykloalkyny³⁸ a reakce tetrazinů s alylovými deriváty *trans*-cyklooktenů³⁹. Vzhledem k mnohem širšímu využití druhé reakce se budeme v tomto oddíle věnovat tomuto typu a jejímu využití v aktivaci léčiv.

Při reakci tetrazinových derivátů s TCO dochází k Dielsově-Alderově reakci a eliminaci molekuly dusíku za vzniku dihydropyridazinů (Schéma 3). Jak bylo popsáno výše, tato reakce nachází široké uplatnění v biokonjugacích. Pokud však TCO obsahuje substituent v alylové poloze, dochází po počátečním konjugačním kroku k sérii elektronových přesunů a následné eliminaci připojeného substituentu. Tuto reakci lze popsat jako uvolnění *clickem* (z angl. *click-to-release*)³⁹.

Účinnost této reakce závisí na několika faktorech, zejména na způsobu připojení substituentu na TCO, na struktuře tetrazinu, a na pH prostředí⁴⁰. K uvolnění látek z alylové polohy TCO lze využít spojení přes karbamáty, karbonáty, estery anebo ethery⁴¹. V závislosti na použité látce pak ve výsledku dochází při reakci k uvolnění aminů nebo alkoholů. Struktura tetrazinu má na celý proces zásadní vliv. Tetraziny nesoucí elektronakceptorní substituenty reagují rychleji v prvním kroku (Dielsova-Alderova reakce), ale nevedou k účinné eliminaci. Na druhou stranu

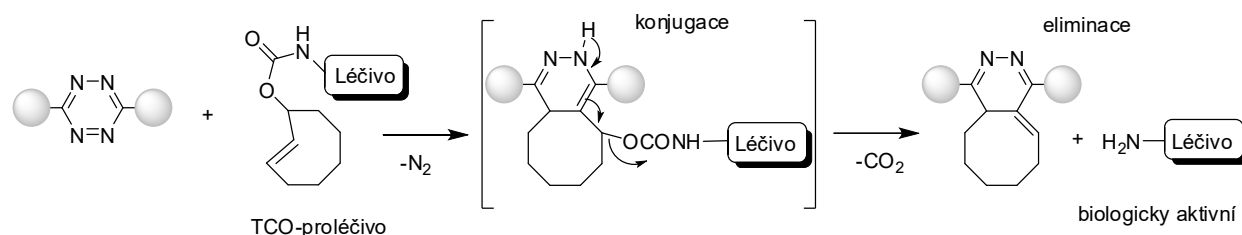


Schéma 4. Eliminací reakce 1,2,4,5-tetrazinů a alylických TCO umožňující aktivaci léčiv

nu, tetraziny nesoucí alky substituenty reagují pomaleji v prvním kroku, ale poskytují mnohem lepší výtěžky při eliminaci⁴². Proces eliminace lze urychlit provedením reakce za kyselých podmínek. Vhodným zavedením karboxylových skupin do struktury tetrazinu lze dosáhnout intramolekulárního přenosu kyselého vodíku, čímž dochází k dalšímu navýšení účinnosti eliminace⁴⁰.

Mezi hlavní využití reakce patří aktivace biologicky aktivních sloučenin z proléčiv⁴³. Jako proléčivo přitom slouží derivát aktivní látky, který obsahuje na vhodném místě TCO substituent (Schéma 4).

Vhodným místem je funkční skupina v rámci molekuly, která je důležitá pro biologickou aktivitu. Tímto způsobem lze blokovat biologickou aktivitu látky (analogue proléčiva), přičemž je následně možné biologickou aktivitu obnovit odštěpením TCO molekuly přidávkem tetrazinu⁴⁴.

Mezi první příklady využití aktivace TCO-proléčiv reakcí s tetraziny lze zařadit aktivaci protinádorové látky doxorubicinu³⁹. Blokadí volné aminogrupy této látky dochází k několikanásobnému snížení biologické aktivity. Následnou aktivací přidávkem tetrazinu se pak biologická aktivita doxorubicinu obnoví.

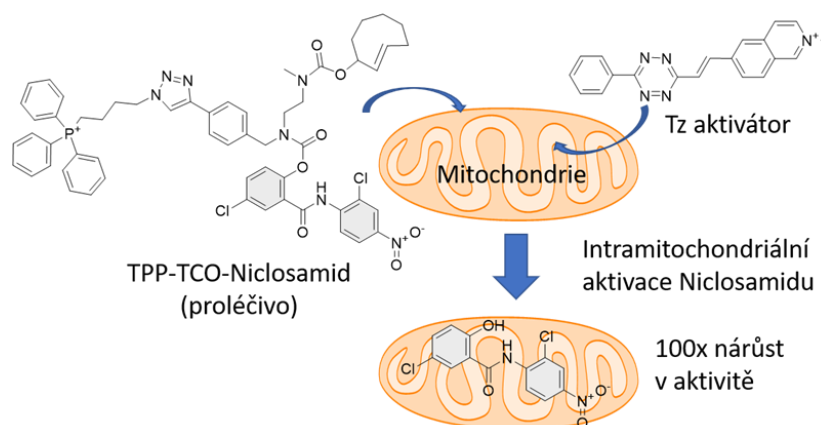
Tuto uvolňovací reakci lze také provádět v prostředí buněk, a dokonce v buněčných organelách. Jako příklad lze uvést specifickou aktivaci Niclosamidu v mitochondriích živých buněk, která vedla k významnému navýšení

účinnosti tohoto léčiva v porovnání s klasickým podáním (obr. 3)⁴⁵.

Další elegantní způsob využití uvolňování clickem byl demonstrován na uvolnění protinádorové látky auristatinu z konjugátu s protilátkou⁴⁶. Výhodou oproti běžným konjugátům tohoto typu je možnost kontrolovaného uvolňování léčiva (přidávkem tetrazinového aktivátoru) a možnost cílení na neinternalizující receptory. Tento způsob aktivace byl úspěšně demonstrován i na myším modelu. Princip uvolňování clickem v kombinaci s využitím biokompatibilních polymerů nesoucích proléčiva je také jedinou bioortogonální reakcí, která je v současnosti v prvních fázích klinických studií na lidech^{21,47}.

5. Vývoj nových bioortogonálních reakcí

Navzdory značnému pokroku v rozvoji a aplikacích zůstává vývoj nových bioortogonálních činidel a reakcí pořád aktuální a důležitý. Důvodem je zejména fakt, že žádná dnes známá bioortogonální reakce není univerzální. Jinými slovy to, který typ reakce je nejlepší použít v konkrétním případě, vždy záleží na zamýšlené aplikaci. Jak už bylo zmíněno v úvodu, bioortogonální reagenty musí být ideálně vysoce reaktivní a stabilní v biologickém prostředí, musí reagovat dostatečně rychle s druhým reaktivním partnerem a nesmí být toxické vůči studovanému



Obr. 3 Intramitochondriální aktivace Niclosamidu z příslušného TCO-proléčiva vedoucí k nárůstu biologické aktivity

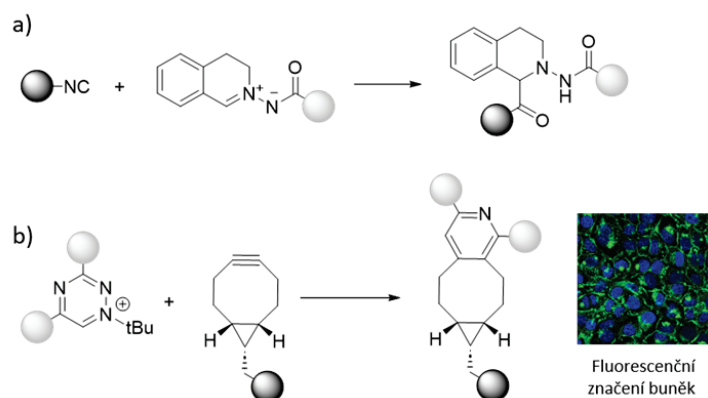


Schéma 5. a) Nová bioortogonální reakce azometin iminů s isonitrily; b) Bioortogonální ligace triaziniových solí a příklad použití při fluorescenčním značení povrchu buněk

organismu. Optimalizace všech těchto vlastností je nedílnou součástí procesu vývoje nových bioortogonálních reagentů a reakcí. Část těchto optimalizací lze provádět v chemické laboratoři, nicméně přenos takto získaných informací do prostředí živých organismů není vždy jednoduchý. Jedním z hlavních důvodů je, že simulovat podmínky v živých organismech je náročné. Přiblížení se realitě použitím pufrů, buněčných médií atd. je sice v oboru běžnou praxí, ale simulovat komplexnost podmínek např. v živých buňkách je náročné, ne-li zcela nemožné. Pokud je tedy cílem použít danou reakci např. pro značení proteinů v živých buňkách, jsou buňky ideálním prostředím pro optimalizaci dané reakce a reagentů. Nicméně optimalizovat chemickou reakci v tak složitém prostředí není triviální.

Mezi nejnovější přírůstky do rodiny bioortogonálních reakcí lze zařadit např. různé reakce katalyzované přechodnými kovy^{48–50} nebo reakce nanozymů, které imitují funkci přírodních enzymů nebo umožňují provádět nové, nepřírodní katalytické reakce⁵¹. Dalším příkladem nových bioortogonálních reagentů jsou azometin iminy (Schéma 5a)⁵². V kombinaci s isonitrily lze azometin iminy použít třeba pro značení proteinů nebo povrchu buněk fluorescenčními značkami. Reakce na přirozených funkčních skupinách proteinů a enzymů představují také důležitou oblast výzkumu. Z novějších metod stojí za zmínku třeba reakce pro modifikaci tyrosinů, která je indukována elektrochemicky⁵³. Mezi nejnovější činidla lze také zařadit N1-alkyl-triaziniové soli (Schéma 5b)⁵⁴. Tento typ reagentů umožňuje elegantní ladění reaktivity, stability a rozpustnosti různou obměnou struktury a substituentů. V reakci s napjatými cykloalkyny umožňuje tato tzv. triaziniová ligace značení biomolekul, jako jsou peptidy nebo proteiny. Navíc reakce dobře probíhá i v živých buňkách, kde umožňuje efektivní značení molekul fluorescenčními značkami za mírných podmínek.

6. Závěr

Bioortogonální reakce dnes nachází uplatnění v oblastech, kde bychom aplikaci chemických reakcí před 20 lety nečekali. Mezi nejslibnější aplikace lze zahrnout např. použití v různých zobrazovacích metodách a při vývoji nových biomedicínských postupů a molekul. Vývoj těchto unikátních nástrojů moderní chemie je náročný a zdoluhavý proces. Bioortogonální reakce dnes umožňují nejen spojení dvou komponent, jako jsou např. biomolekuly a malé syntetické látky, ale staly se i nástrojem pro aktivaci léčivých látek slibující účinnější, specifitější a bezpečnější léčbu různých závažných onemocnění. Vzhledem k dosaženým výsledkům lze očekávat, že rozvoj této vědní disciplíny bude pokračovat i v budoucnu a že kombinace vědních disciplín za hranicemi chemie a biologie nám otevře nové možnosti pro studium biologických systémů a pro vývoj lepších diagnostických a biomedicínských nástrojů.

Tato práce byla podpořena institucionálním financováním ÚOCHB AV ČR (RVO: 61388963) a projektem Národní institut pro výzkum metabolických a kardiovaskulárních onemocnění (Program EXCELES, ID: LX22NPO5104) – Financováno Evropskou unií – Next Generation EU. Poděkování patří všem bývalým i současným studentům a spolupracovníkům uvedeným jako spoluautoři citovaných publikací.

LITERATURA

- Sletten E. M., Bertozzi C. R.: *Acc. Chem. Res.* **44**, 666 (2011).
- Saxon E., Bertozzi C. R.: *Science* **287**, 2007 (2000).
- Kolb H. C., Finn M. G., Sharpless K. B.: *Angew. Chem., Int. Ed.* **40**, 2004 (2001).
- Rostovtsev V. V., Green L. G., Fokin V. V., Sharpless K. B.: *Angew. Chem., Int. Ed.* **41**, 2596 (2002).

5. Tornøe C. W., Christensen C., Meldal M.: *J. Org. Chem.* **67**, 3057 (2002).
6. Meldal M., Tornøe C. W.: *Chem. Rev.* **108**, 2952 (2008).
7. Haldón E., Nicasio M. C., Pérez P. J.: *Org. Biomol. Chem.* **13**, 9528 (2015).
8. Meldal M., Diness F.: *Trends Chem.* **2**, 569 (2020).
9. Kennedy D. C., McKay C. S., Legault M. C. B., Danielson D. C., Blake J. A., Pegoraro A. F., Stolorow A., Mester Z., Pezacki J. P.: *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 17993 (2011).
10. Presolski S. I., Hong V., Cho S. H., Finn M. G.: *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 14570 (2010).
11. Besanceney-Webler C., Jiang H., Zheng T. Q., Feng L., del Amo D. S., Wang W., Klivansky L. M., Marlow F. L., Liu Y., Wu P.: *Angew. Chem., Int. Ed.* **50**, 8051 (2011).
12. Agard N. J., Prescher J. A., Bertozzi C. R.: *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 15046 (2004).
13. Debets M. F., van Berkel S. S., Dommerholt J., Dirks A. J., Rutjes F. P. J. T., van Delft F. L.: *Acc. Chem. Res.* **44**, 805 (2011).
14. Dommerholt J., Rutjes F. P. J. T., van Delft F. L.: *Top. Curr. Chem.* **374**, (2016).
15. Knall A. C., Slugovc C.: *Chem. Soc. Rev.* **42**, 5131 (2013).
16. Oliveira B. L., Guo Z., Bernardes G. J. L.: *Chem. Soc. Rev.* **46**, 4895 (2017).
17. Darko A., Wallace S., Dmitrenko O., Machovina M. M., Mehl R. A., Chin J. W., Fox J. M.: *Chem. Sci.* **5**, 3770 (2014).
18. Fang Y., Zhang H., Huang Z., Scinto S. L., Yang J. C., am Ende Christopher W., Dmitrenko O., Johnson D. S., Fox J. M.: *Chem. Sci.* **9**, 1953 (2018).
19. Zhao G. X., Li Z. T., Zhang R. S., Zhou L. M., Zhao H. B., Jiang H. F.: *Front. Mol. Biosci.* **9**, (2022).
20. Mitry M. M. A., Greco F., Osborn H. M. I.: *Chem. Eur. J.* **29**, (2023).
21. Peplow M.: *Nat. Biotechnol.* **41**, 883 (2023).
22. Gonçalves M. S. T.: *Chem. Rev.* **109**, 190 (2009).
23. Yang J., Zhu B., Ran C.: *Chem. Biomed. Eng.* **1**, 434 (2023).
24. Liu J., Cui Z. Q.: *Bioconjugate Chem.* **31**, 1587 (2020).
25. Zhang G., Zheng S. Q., Liu H. P., Chen P. R.: *Chem. Soc. Rev.* **44**, 3405 (2015).
26. Kozma E., Demeter O., Kele P.: *ChemBioChem* **18**, 486 (2017).
27. Liu C. C., Schultz P. G.: *Annu. Rev. Biochem.* **79**, 413 (2010).
28. Nadler A., Schultz C.: *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **52**, 2408 (2013).
29. Choi S. K., Kim J., Kim E.: *Molecules* **26**, 1868 (2021).
30. Pinto-Pacheco B., Carbery W. P., Khan S., Turner D. B., Buccella D.: *Angew. Chem., Int. Ed.* **59**, 22140 (2020).
31. Kaya E., Vrabel M., Deiml C., Prill S., Fluxa V. S., Carell T.: *Angew. Chem., Int. Ed.* **51**, 4466 (2012).
32. Kumar G. S., Racioppi S., Zurek E., Lin Q.: *J. Am. Chem. Soc.* **144**, 57 (2022).
33. Kumar G. S., Lin Q.: *Chem. Rev.* **121**, 6991 (2021).
34. Siegl S. J., Galeta J., Dzijak R., Vázquez A., Del Río-Villanueva M., Dracinsky M., Vrabel M.: *ChemBioChem* **20**, 886 (2019).
35. Siegl S. J., Vazquez A., Dzijak R., Dracinsky M., Galeta J., Rampmaier R., Klepetarova B., Vrabel M.: *Chem. Eur. J.* **24**, 2426 (2018).
36. Vazquez A., Dzijak R., Dracinsky M., Rampmaier R., Siegl S. J., Vrabel M.: *Angew. Chem., Int. Ed.* **56**, 1334 (2017).
37. Li J., Chen P. R.: *Nat. Chem. Biol.* **12**, 129 (2016).
38. Ribéraud M. a 12 spoluautorů: *J. Am. Chem. Soc.* **145**, 2219 (2023).
39. Versteegen R. M., Rossin R., ten Hoeve W., Janssen H. M., Robillard M. S.: *Angew. Chem., Int. Ed.* **52**, 14112 (2013).
40. Carlson J. C. T., Mikula H., Weissleder R.: *J. Am. Chem. Soc.* **140**, 3603 (2018).
41. Versteegen R. M., ten Hoeve W., Rossin R., de Geus M. A. R., Janssen H. M., Robillard M. S.: *Angew. Chem., Int. Ed.* **57**, 10494 (2018).
42. Fan X. Y. a 11 spoluautorů: *Angew. Chem., Int. Ed.* **55**, 14046 (2016).
43. Ji X. Y., Pan Z. X., Yu B. C., De la Cruz L. K., Zheng Y. Q., Ke B. W., Wang B. H.: *Chem. Soc. Rev.* **48**, 1077 (2019).
44. Neumann K., Gambardella A., Bradley M.: *ChemBioChem* **20**, 872 (2019).
45. Dzijak R., Galeta J., Vázquez A., Kozák J., Matoušová M., Fulka H., Dračinský M., Vrabel M.: *JACS Au* **1**, 23 (2021).
46. Rossin R. a 10 spoluautorů: *Nat. Commun.* **9**, 1484 (2018).
47. McFarland J. M., Aleckovic M., Coricor G., Srinivasan S., Tso M., Lee J. H., Nguyen T. H., Oneto J. M. M.: *ACS Cent. Sci.* **9**, 1400 (2023).
48. Liu X., Huang T. J., Chen Z. W., Yang H. H.: *Chem. Commun.* **59**, 12548 (2023).
49. James C. C., de Bruin B., Reek J. N. H.: *Angew. Chem., Int. Ed.* **62**, e202306645 (2023).
50. Tomás-Gamasa M., Martínez-Calvo M., Couceiro J. R., Mascareñas J. L.: *Nat. Commun.* **7**, 12538 (2016).
51. Keum C., Hirschbiegel C. M., Chakraborty S., Jin S., Jeong Y., Rotello V. M.: *Nano Convergence* **10**, 42 (2023).
52. Markos A., Biedermann M., Heimgärtner J., Schmitt A., Lang K., Wennemers H.: *J. Am. Chem. Soc.* **145**, 19513 (2023).
53. Alvarez-Dorta D., Thobie-Gautier C., Croyal M., Bouzelha M., Mevel M., Deniaud D., Boujtita M., Gouin S. G.: *J. Am. Chem. Soc.* **140**, 17120 (2018).
54. Šlachtová V. a 10 spoluautorů: *Angew. Chem., Int. Ed.* **62**, e202306828 (2023).

M. Vrábek and V. Šlachtová (*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Czech Academy of Sciences, Prague, Czech Republic*): **Development and Application of Bioorthogonal Reactions for Drug Imaging and Activation**

Chemical transformations compatible with biological systems serve as invaluable tools for probing biomolecules, drug compounds, and biological processes in their native environments. The complex environment of living organisms requires these reactions to be highly selective and efficient, posing a formidable challenge to the field of organic chemistry. A number of chemical reactions have recently emerged to meet this challenge, providing a diverse toolkit for researchers. This manuscript presents a comprehensive survey of current bioorthogonal reactions, emphasizing their applications in bioimaging, diagnostics, and medicine.

Keywords: click chemistry, bioorthogonal reactions, imaging, fluorescent labeling, prodrugs

Acknowledgements

This work was supported by the institutional funding of the IOCB of the Czech Academy of Sciences (RVO: 61388963) and by the National Institute for Research on Metabolic and Cardiovascular Diseases (Program EXCELES, ID: LX22NPO5104) – Funded by the European Union – Next Generation EU. We would like to thank to all former and current students and collaborators listed as co-authors of the cited publications.



Užití tohoto díla se řídí mezinárodní licencí Creative Commons Attribution License 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.cs>), která umožňuje neomezené využití, distribuci a kopírování díla pomocí jakéhokoli média, za podmínky řádného uvedení názvu díla, autorů, zdroje a licence.

TAU PROTEIN V BIOLOGICKÝCH TEKUTINÁCH A JEHO KLINICKÝ VÝZNAM

LENKA FIALOVÁ^{a,b}, LIBUŠE NOSKOVÁ^a a TOMÁŠ ZIMA^a

^a Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky, 1. lékařská fakulta, Univerzita Karlova a Všeobecná fakultní nemocnice v Praze, Praha, ^b Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva, Fakulta biomedicínského inženýrství, České vysoké učení technické v Praze, Praha, Česká republika
lenka.fialova@lf1.cuni.cz, libuse.noskova@lf1.cuni.cz, tomas.zima@lf1.cuni.cz

Došlo 4.4.23, přepracováno 18.12.23, přijato 2.1.24.

Tau protein je jedním z neurocytoskeletálních proteinů podílejících se na patogenezi závažných neurologických onemocnění, zejména Alzheimerovy nemoci. Vyznačuje se značnou strukturní variabilitou, která se odráží v existenci jeho četných proteoform. Tento přehled si klade za cíl poskytnout stručné informace o struktuře tau proteinu a jeho proteoformách, které se zdají být perspektivní jako biomarkery pro klinické použití. Jsou diskutovány biologické tekutiny vhodné pro laboratorní vyšetření v klinické praxi, tj. mozkomíšní mok a krev (plazma/sérum). Celkový tau protein a jeho fosforylované formy (hlavně protein pT181-tau, fosforylovaný na threoninovém zbytku 181) již našly klinické uplatnění v diagnostice Alzheimerovy nemoci.

Klíčová slova: tau protein, proteoforma, posttranslační modifikace, fosforylace, proteolýza, Alzheimerova nemoc, mozkomíšní mok, krev

Obsah

1. Úvod
2. Struktura tau proteinu
3. Tau protein v různých biologických tekutinách a jeho klinický význam
 - 3.1. Tau protein v mozkomíšním moku
 - 3.2. Tau protein v krvi
 - 3.3. Tau protein ve slině
 - 3.4. Tau protein v extracelulárních váčcích
4. Závěr

1. Úvod

Tau (τ = tubulin-associated unit) protein je jeden z neurocytoskeletálních proteinů, který se uplatňuje v patogenezi závažných neurologických onemocnění. Byl popsán v roce 1975 jako protein, který navozuje vytváření mikrotubulů^{1,2}.

Poté, co byla zjištěna souvislost tau proteinu s Alzheimerovou nemocí (AN), zaměřila se na protein mimořádná pozornost badatelů jak na úrovni základního, tak aplikovaného výzkumu³. Patologické změny struktury a koncentrací tau proteinu v biologických tekutinách se neomezují pouze na AN, ale jsou popisovány i u dalších neurodegenerativních a akutních neurologických onemocnění⁴⁻⁹.

Neustále přibývá mnoho nových poznatků o fyziologické funkci tau proteinu i patobiochemických změnách

u různých neurologických onemocnění. Rozvíjejí se i analytické metody umožňující stanovovat koncentrace některých proteoform/isoform tau proteinu v biologických tekutinách nejen pro výzkumné účely, ale i v klinické praxi^{10,11}. V současnosti jsou dostupné manuální metody ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) nebo imunoanalytické metody pro automatické analyzátoři na bázi elektrochemiluminescence, využívané pro stanovení tau proteinu v mozkomíšním moku (MMM). Některá pracoviště jsou vybavena i analyzátoři pro vysoce citlivé metody na bázi SIMOA (single molecule array) pro stanovení tau proteinů v krvi (plazmě, séru), která představuje mnohem dostupnější biologickou tekutinu, než je MMM. Lze proto předpokládat, že vyšetření tau proteinů se stane dostupnější.

Následující text si klade za cíl poskytnout stručnou informaci o struktuře tau proteinu a jeho proteoformách, které se zdají být perspektivní pro klinické využití. Budou uvedeny vybrané neuropatologické stavy doprovázené změnami koncentrací tau proteinu a jeho proteoform v biologických tekutinách, které jsou vhodné pro laboratorní vyšetření v klinické praxi, jako je MMM a krev, resp. plazma nebo sérum.

2. Struktura tau proteinu

Struktura tau proteinu se vyznačuje vysokou variabilitou podmiňující existenci různých proteoform. Ty zahr-

nují isoformy vzniklé na podkladě alternativního sestřihu, které jsou dále upravovány četnými posttranslačními modifikacemi (obr. 1). Lidský gen pro tau protein je umístěn na dlouhém raménku chromosomu 17, konkrétně na pozici 17q21 (cit.¹²). Produkce tau proteinu dominuje v neuronech centrálního nervového systému (CNS), probíhá i v neuronech periferního nervového systému (PNS) a byla prokázána v dalších buňkách nervové tkáně i jiných tkání^{13,14}.

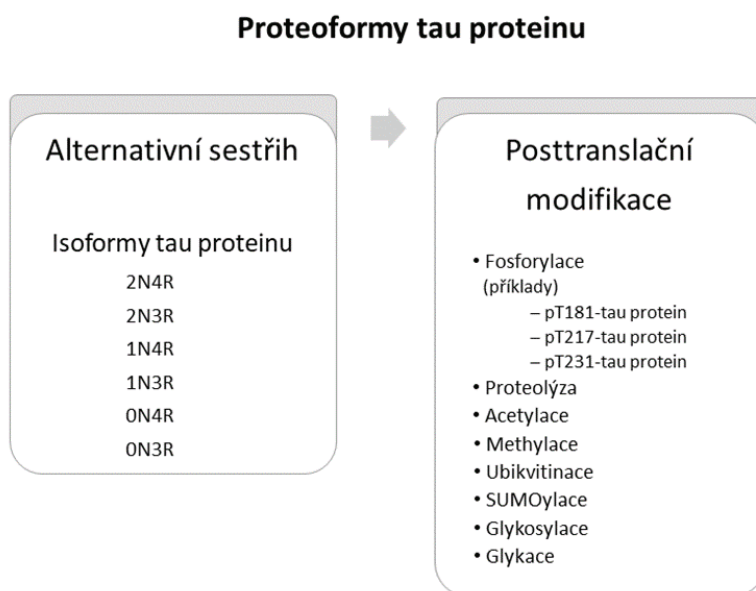
V molekule tau proteinu lze rozlišit dvě domény (projekční doménu a doménu spojenou s mikrotubuly), které jsou znázorněné a popsány na obr. 2A. Vzhledem k vysoké flexibilitě polypeptidového řetězce je tau protein řazen mezi proteiny s vnitřně neuspořádanou strukturou, umožňující zaujímat proměnlivé konformace, vázat se s dalšími strukturami a plnit rozmanité funkce¹⁵. V důsledku alternativního sestřihu pre-mRNA může v lidském mozku vzniknout šest isoform tau proteinu o délce 352–441 aminokyselinových zbytků a relativní molekulové hmotnosti v rozmezí 37 000–46 000. Uvedené isoformy se odlišují přítomností či absencí jednoho nebo dvou inzertů v blízkosti N-konce a přítomností tří nebo čtyř repetitivních sekvencí lokalizovaných blíže C-konce (obr. 2B) (cit.^{15,16}). V PNS je přítomen tau protein o vyšší molekulové hmotnosti ($M_r = 72\ 700$). Je ekvivalentní isoformě 2N4R, která je delší o 242 aminokyselinových zbytků z exonu 4a (cit.¹⁵).

Tau protein podléhá četným posttranslačním modifikacím zahrnujícím fosforylaci, acetylaci, metylaci,

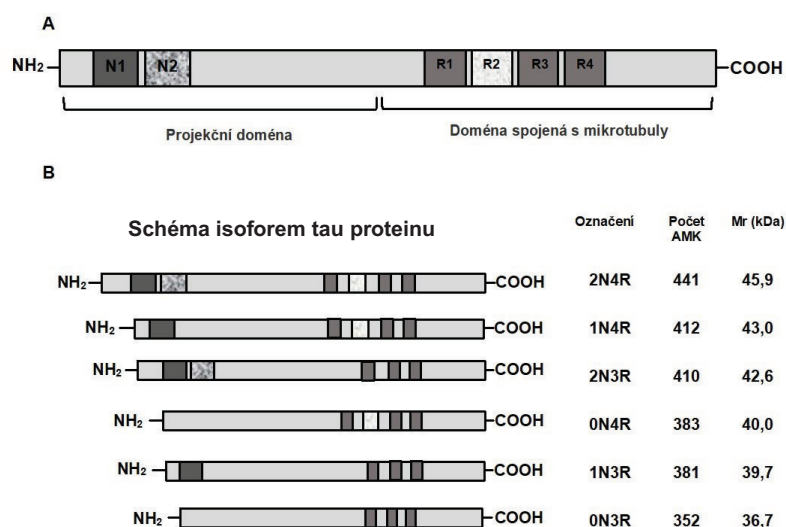
ubikvitinaci, částečnou proteolýzu, glykosylaci, neenzymovou glykaci a další^{16–18}. Posttranslační úpravy tau proteinu mohou být součástí fyziologických procesů, ale řada z nich souvisí s patologickými změnami v mozku¹⁸.

K intenzivně studovaným modifikacím struktury tau proteinu vztahujícím se k patogenezi AN řadíme fosforylaci a proteolytické štěpení^{15,19}. Molekula nejdelší formy mozkového tau proteinu obsahuje celkem 85 zbytků serinu, threoninu a tyrosinu, které představují potenciální fosforylační místa²⁰. V normálním mozku dospělých jedinců převažují tau proteiny fosforylované přibližně na dvou až třech fosforylačních místech, zatímco u AN je na tau proteinech fosforylováno osm i více fosforylačních míst^{15,21}. Abnormální fosforylace tau proteinu omezuje jeho kontakt s mikrotubuly a může se podílet na vytváření agregátů^{14,16,22}. Agregovaný tau protein je ve své hyperfosforylované formě součástí jedné ze základních neuropatologických struktur, tzv. neurofibrilárních smotků pozorovaných v mozku pacientů s AN (cit.²³).

V mozkové tkáni i v biologických tekutinách se kromě nativního tau proteinu vyskytují i jeho různé fragmenty. Mohou mít původ v běžném metabolismu tau proteinu, ale některé z fragmentů byly nalezeny i v neurofibrilárních smotcích a jsou považovány za specifické produkty u AN nebo u jiných tauopatií^{19,24,25}. Přepokládá se, že C-koncové fragmenty zůstávají uloženy intracelulárně, zatímco N-koncové, popř. další fragmenty jsou uvolňovány do extracelulárního prostoru²⁶.



Obr. 1. **Proteoformy tau proteinu.** Na schématu je uvedeno šest isoform tau proteinu vzniklých alternativním sestřihem pre-mRNA v mozku a některé z posttranslačních modifikací. N – inzerty v N-koncové části molekuly tau proteinu; R – repetitivní sekvence v C-koncové části molekuly tau proteinu; pT181 – fosforylace na threoninovém zbytku 181; pT217 – fosforylace na threoninovém zbytku 217; pT231 – fosforylace na threoninovém zbytku 231.



Obr. 2. **Struktura tau proteinu a jeho isoformy.** A: V molekule tau proteinu jsou popisovány dvě domény. Projekční doména ovlivňuje rozestupy axonálních mikrotubulů a interakce s dalšími součástmi buňky a jinými molekulami. Doména spojená s mikrotubuly se účastní seskupování a udržování stability mikrotubulů. Pro střední část molekuly je charakteristické bohatší zastoupení prolinových zbytků. B: Alternativním sestřihem může vzniknout šest isoform tau proteinu. Odlišují se přítomností jednoho nebo dvou inzertů (2N, 1N) nebo jejich absencí (0N) lokalizovaných v N-koncové části molekuly a přítomností buď tří (3R) nebo čtyř (4R) repetitivních sekvencí v C-terminální polovině tau proteinu^{15–17}.

3. Tau protein v různých biologických tekutinách a jeho klinický význam

Tau protein lokalizovaný intracelulárně v různých subcelulárních kompartmentech²⁷ proniká i mimo buňku. Děje se to nejen za patologických situací jako např. v důsledku smrti neuronů, nebo při různých tauopatiích, ale i za fyziologických podmínek při zvýšené aktivitě neuronů může být tau protein z buňky secernován^{28,29}. Svědčí o tom i studie, v níž byl pomocí mikrodialýzy tau protein prokázán v intersticiální tekutině mozku myši, které nevykazovaly známky neurodegenerace³⁰. Sato a spol.²⁶ se domnívají, že nativní tau protein přestupuje do extracelulárního prostoru pasivně např. v důsledku buněčné smrti, zatímco zkrácené formy jsou mimo buňku uvolňovány aktivně.

Sekrece tau proteinu do extracelulárního prostředí se uskutečňuje především nekonvenčními sekrečními mechanismy, které se intenzivně zkoumají. Předpokládá se, že tau protein může být z neuronů uvolňován jako volná molekula translokací přes buněčnou membránu, nebo prostřednictvím extracelulárních váčků^{28,29,31}. Z intersticiální tekutiny je možný přestup proteinů do MMM i do krve³² (obr. 3).

Koncentrace tau proteinu v biologických tekutinách v různé míře odráží neuropatologické procesy v CNS. Cenné informace o změnách koncentrací tau proteinů u řady neurologických onemocnění byly získány analýzou MMM a přibývá studií zabývajících se analýzou plazmy či séra^{4,6,33–36}. Sporadické údaje jsou dostupné i pro další,

méně obvyklé biologické tekutiny, jako je slina nebo slzy či sekret z dutiny nosní^{37–39}. Jednotlivé matrice vykazují určité zvláštnosti, které je zapotřebí brát v úvahu při interpretaci výsledků vyšetření tau proteinu jako biomarkeru⁴⁰.

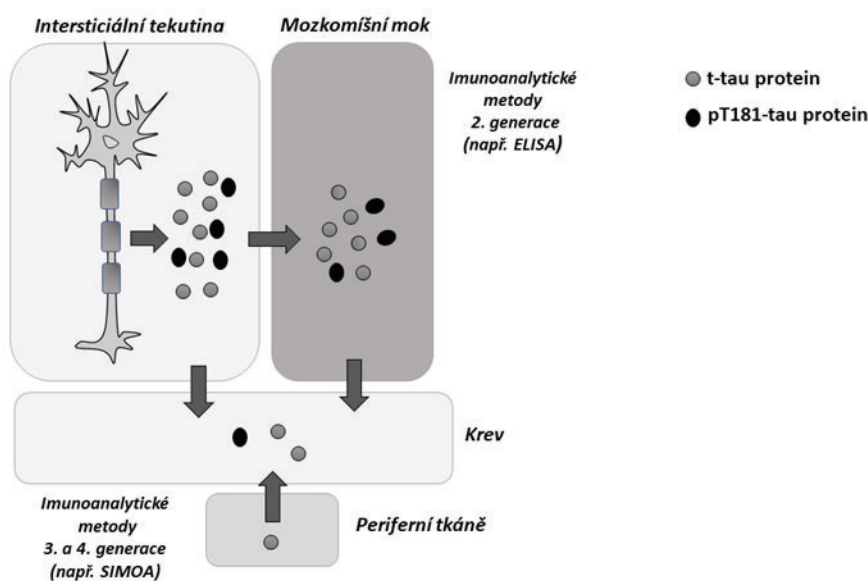
V biologických tekutinách jsou prokazovány různé proteoformy tau proteinu, jejichž zastoupení se v nich může odlišovat^{4,14,24,41–43}. Přítomnost proteoform komplikuje stanovení tau proteinu. Na druhé straně průkaz konkrétních proteoform poskytuje cenné informace pro diferenciální diagnostiku neuropatologických stavů. V současnosti je tau protein v MMM a krvi (séru, plazmě) zpravidla vyšetřován jako celkový tau (t-tau) protein, zahrnující všechny proteoformy bez ohledu na fosforylaci a všechny fragmenty obsahující střední oblast molekuly tau proteinu. Dále jsou stanovovány některé proteoformy fosforylované na určitých místech polypeptidového řetězce. Objevují se i zprávy o metodách pro analýzu konkrétních fragmentů tau proteinu na bázi SIMOA (cit.^{42,43}).

3.1. Tau protein v mozkomíšním moku

Celkový tau protein

Hodnoty koncentrací t-tau proteinu v MMM se u zdravých osob pohybují řádově v desítkách až stovkách pg ml^{-1} . Dle naší studie je medián koncentrací (10.–90. percentil) u kontrolních osob 228 (128–377) pg ml^{-1} (cit.⁴⁴).

Celkový tau protein je považován za obecný biomarker neuronálního poškození bez ohledu na příčinu⁴⁵. Zvýšené koncentrace t-tau proteinu v MMM odrážejí poškození axonů a smrt neuronů u AN i jiných demenci a u roz-



Obr. 3. **Tau protein v biologických tekutinách.** Z mozkových buněk proniká tau protein v různých formách do intersticiální tekutiny. Z intersticiální tekutiny je možný přestup do mozkomíšního moku, v němž je možné stanovení celkového tau proteinu a pT181-tau proteinu pomocí imunanalytických metod jako je např. ELISA. Do krve se tau proteiny mohou dostat z mozkomíšního moku, ale nelze vyloučit ani původ tau proteinu z periferních tkání. Pro stanovení výrazně nižších koncentrací tau proteinů v plazmě/séru je zapotřebí citlivějších imunanalytických metod, např. na bázi SIMOA^{32,76,77}.

troušené sklerózy^{7,8,46,47}. Mimořádně vysoké hodnoty jsou zaznamenávány u onemocnění, u nichž dochází k rychlé neurodegeneraci, jako je Creutzfeldtova-Jakobova nemoc^{7,48}. Nárůst koncentrací t-tau proteinu v MMM doprovází také stavy způsobené poškozením neuronů jako je tomu u úrazů hlavy s poškozením mozku, cévních mozkových příhod, stavů po srdeční zástavě a u některých neuroinfekcí^{5,9,49}.

Fosforylované formy tau proteinu

Intenzivně zkoumanými proteoformami tau proteinu v MMM jsou jeho fosforylované formy, jejichž zvýšené koncentrace jsou považovány za specifitější nález u AN než zvýšené koncentrace t-tau proteinu⁵⁰. Hyperfosforylovaný tau (p-tau) protein v MMM společně s t-tau proteinem a β -amyloidem představují základní biomarkery, které byly zařazeny mezi výzkumná diagnostická kritéria AN a parametry nové biologické klasifikace AN pomocí tzv. AT(N) profilu (A – β -amyloid, T – p-tau protein a N – t-tau protein) (cit.⁵⁰). Fosforylace tau proteinu v mozku je pokládána za dynamický proces. Studium vybraných fosforylovaných tau proteinů naznačuje, že jejich koncentrace odrážejí časné poruchy v metabolismu tau proteinu ještě v preklinickém stádiu AN, pravděpodobně jako reakci na počáteční patologické změny β -amyloidu⁵¹.

Nejvíce dat bylo dosud shromážděno pro tau protein fosforylovaný na threoninovém zbytku 181 (pT181-tau). Je jedním z užívaných biomarkerů u AN jako součást je-

jich tripletu, který kromě pT181-tau proteinu zahrnuje celkový tau protein a β -amyloid (cit.^{44,52}). Tvoří asi 20 % z celkového tau proteinu. pT181-tau protein představuje specifický biomarker pro patologické změny u AN a je považován za „zlatý standard“ pro diagnostiku AN při vyšetřování MMM (cit.⁵³). Námi stanovený medián pT181-tau proteinu pro kognitivně zdravé osoby byl 26 pg ml^{-1} ($15\text{--}52 \text{ pg ml}^{-1}$; 10.–90. percentil, použita souprava Euroimmun)⁴⁴.

K dalším perspektivním fosforylovaným tau proteinům v MMM můžeme zařadit p-tau proteiny fosforylované na aminokyselinovém zbytku threoninu 217 (pT217-tau) a 231 (pT231-tau)^{51,53,54}. Oba tyto fosforylované tau proteiny byly označeny za specifitější biomarkery pro AN než pT181-tau protein. Přínos pT231-tau proteinu může být zejména ve velmi časných, ještě preklinických stádiích AN. Zajímavá je fosforylace na aminokyselinovém zbytku threoninu 153, která byla prokázána výlučně u pacientů s AN (cit.⁵⁵).

Fragmenty tau proteinu

Na rozdíl od lidského mozku, v němž je tau protein přítomen jak v nezkrácené formě, tak i v podobě fragmentů, v MMM kontrolních osob i nemocných s AN je tau protein prokazován převážně jako směs různých fragmentů^{24,56}. Mezi nimi převažují ty, které obsahují N-koncové a střední části molekuly (aminokyselinové zbytky 1 až přibližně 230). Zastoupení různých fragmentů

je však odlišné u pacientů s AN a u kontrolních skupin^{24,25}. Může to být ovlivněno různými mechanismy clearance tau proteinu (proteolytické štěpení, degradace pomocí proteasomu nebo autofagie), které mohou být zastoupeny v odlišném poměru u pacientů s AN a u zdravých jedinců. Hyperfosforylace proteinu u pacientů s AN může ovlivnit funkci některých proteas, které se štěpení tau proteinu účastní. Podobně některé další patofyziologické změny u AN mohou zvýšit aktivitu některých proteas⁵⁷.

Podle Sato a spol.²⁶ ke štěpení tau proteinu dochází fyziologicky mezi aminokyselinovými zbytky 222 a 225. Některé práce popisují v MMM i přítomnost nezkrácené formy tau proteinu, ale ve velmi nízkých koncentracích, k jejichž stanovení je zapotřebí vysoce citlivých metod^{43,58}. Nebyl prokázán rozdíl v koncentracích nezkrácené formy tau proteinu u pacientů s AN a kontrolní skupiny. Předpokládá se, že průkaz nezkráceného tau proteinu v MMM není důsledek patologických změn u AN (cit.⁴³).

Oligomery a isoformy tau proteinu vzniklé na úrovni štěpení pre-mRNA

Další formou tau proteinu v MMM jsou oligomery, které zatím stojí na okraji pozornosti. Nicméně byla zjištěna vyšší koncentrace tau proteinu ve formě oligomeru u pacientů s AN než u kontrolní skupiny⁵⁹.

Pro studium jednotlivých isoform vzniklých na úrovni alternativního štěpení pre-mRNA byly využity náročné metody hmotnostní spektrometrie s cílenou proteomikou. Byly identifikovány rozdíly v zastoupení uvedených isoform v MMM u kontrolních vzorků a u pacientů s AN, u nichž dominovala isoforma 1N/3R (cit.⁶⁰).

3.2. Tau protein v krvi

Proteiny mozkového původu mohou proniknout i do krve, i když mechanismus jejich přestupu do cirkulace není plně objasněn. Může se uplatňovat resorpce do žilní krve i tzv. glymfatický systém a nelze vyloučit ani přímý přestup z mozku do krve přes hematoencefalickou bariéru³² (obr. 3).

Na rozdíl od MMM je koncentrace tau proteinu v krvi ovlivňována dalšími faktory⁶¹. V krevním oběhu se proteiny naředí v mnohem větším distribučním objemu, takže jejich koncentrace se několásobně sníží. V krvi může pokračovat proteolytické štěpení mozkových proteinů. Vliv na koncentraci tau proteinu může mít vylučování proteinů ledvinami a metabolismus v játrech. Kromě výše uvedených rozdílů představuje sérum/plazma v porovnání s MMM mnohem komplikovanější matici, zejména vzhledem k řádově vyšším koncentracím bohatého spektra bílkovin. V krevní cirkulaci také nelze vyloučit možnost přítomnosti analytu produkovaného v periférii mimo CNS. Na rozdíl od MMM je v plazmě vyšší podíl nezkráceného tau proteinu, který může pocházet z periferních zdrojů⁴³. Tyto okolnosti přispívají k tomu, že korelace mezi koncentracemi t-tau proteinu v plazmě a MMM nejsou silné^{33,62,63}.

Jak vyplývá z předchozího, v krvi se tau protein vyskytuje v různých formách a jejich zastoupení ve srovnání s MMM není identické⁴³. Podobně jako v MMM i v plazmě, popř. séru je tau protein stanovován jako celkový – t-tau protein a k dispozici jsou i metody pro stanovení vybraných proteoform, zejména různě fosforylovaných tau proteinů⁶⁴.

Celkový tau protein

Tau protein je přítomen v plazmě/séru v řádově nižších koncentracích než v MMM, a to nejen za fyziologického stavu, ale i za patologických okolností⁶². Na základě metaanalýzy studií, v nichž jako analytická metoda pro stanovení tau proteinu posloužila vysoce citlivá metoda SIMOA, byla u zdravých osob určena průměrná koncentrace celkového tau proteinu v plazmě 3,07 pg ml⁻¹ (cit.³⁵). Koncentrace tau proteinu v plazmě/séru jsou zvýšené u pacientů s AN, ale také v případech akutního poškození mozku z důvodů traumatu, iktu nebo srdeční zástavy^{6,35,65–67}. Pro srovnání jsou v tab. I uvedeny koncentrace t-tau proteinu stanovené na platformě SIMOA u vybraných patologických stavů.

Fosforylované formy

Klinické studie se soustředily zejména na plazmatické koncentrace těch fosforylovaných forem, které se ukázaly být klinicky přínosné při stanovení v MMM – pT181-tau, pT217-tau a pT231-tau proteinů. Z klinických studií zatím vyplývá, že podobně jako koncentrace v MMM i plazmatické koncentrace uvedených fosforylovaných forem tau proteinu by mohly být využity jako přínosné biomarkery u AN, popř. i dalších demencí⁶⁴. K dispozici je více údajů o plazmatických koncentracích pT181-tau proteinu, které korelují s koncentracemi v MMM (cit.^{35,68}). Průměrné koncentrace pT181-tau proteinu 11,18 pg ml⁻¹, které vyloučily z metaanalýzy, převyšují koncentrace t-tau proteinu. Tato diskrepance je vysvětlována odlišnou kalibrací při stanovení obou analytů při použití souprav na platformě SIMOA (cit.³⁵).

Oligomery

Oligomery v séru byly stanovovány podle našich informací u pacientů s AN a mírnou kognitivní poruchou pouze v jedné studii pomocí metody ELISA (cit.⁶⁹). Bylo pouze zjištěno signifikantní snížení koncentrací oligomerů u pacientů s mírnou kognitivní poruchou.

3.3. Tau protein ve slině

Slina je perspektivní biologickou tekutinou, jejíž odběr nevyžaduje žádný invazivní výkon. Kromě tau proteinu, který do slin může přestoupit z krevního oběhu, nelze vyloučit jako další zdroj sekreční buňky slinných žláz exprimující mRNA pro tau protein, nebo exkreci z axonů nervů inervujících slinné žlázy. Výhodou je skutečnost, že koncentrace t-tau proteinu ve slině stanovená vysoce citlivou metodou SIMOA je přibližně čtyřikrát

Tabulka I

Koncentrace celkového tau (t-tau) proteinu v plazmě stanovené metodou SIMOA (single molecule array) u vybraných patologických stavů

Onemocnění	Počet pacientů	Koncentrace t-tau proteinu [pg ml ⁻¹] u skupiny nemocných	Počet osob v kontrolní skupině	Koncentrace t-tau proteinu [pg ml ⁻¹] u kontrolní skupiny	Lit.
Alzheimerova nemoc	168	3,1 ± 1,3 (průměr ± SD)	166	2,7 ± 1,0 (průměr ± SD)	73
Mírná kognitivní porucha	174	2,81 ± 1,20 (průměr ± SD)	166	2,7 ± 1,0 (průměr ± SD)	73
Preeklampsie (37. týden těhotenství)	16	4,33 (3,97–12,83) medián (interkvartilové rozmezí)	36	3,77 (1,91–5,25) medián (interkvartilové rozmezí)	74
Traumatické poranění mozku	34	9,56 (5,90–17,10) medián (interkvartilové rozmezí)	69	4,1 (2,3–5,6) medián (interkvartilové rozmezí)	65
Stav po srdeční zástavě	73 (příznivý průběh) 39 (nepříznivý průběh)	9,9 (6,4–18,1) 12,7 (8,3–25,3) medián (interkvartilové rozmezí)	–	–	66
Sporadická Creutzfeldtova-Jakobova choroba	83	45,1 ± 48,7 (průměr ± SD)	70	2,5 ± 1,2 (průměr ± SD)	75

vyšší než v plazmě⁷⁰. Pro zhodnocení klinického přínosu stanovení tau proteinu ve slině existuje zatím omezený počet studií.

3.4. Tau protein v extracelulárních váčcích

Pozornost byla věnována nejen volnému tau proteinu v biologických tekutinách, ale i tau proteinu transportovanému v extracelulárních váčcích izolovaných z krve nebo MMM. Byly v nich prokázány různé formy tau proteinu^{58,71,72}. Intaktní molekuly se vyskytovaly v menším množství ve srovnání s fragmenty tau proteinu obsahujícím střední oblast molekuly⁵⁸. V exosomech z MMM byl zkoumán také tau protein fosforylovaný na vybraných aminokyselinových zbytcích. Nebyly zjištěny rozdíly mezi kontrolní skupinou a pacienty s AN. V exosomech z MMM kontrolní skupiny i pacientů s AN byla prokázána i přítomnost tau proteinu ve formě oligomerů (trimerů)⁷¹.

4. Závěr

Tau protein se vyznačuje značnou strukturální variabilitou, která podmiňuje existenci jeho četných proteoformů. Pokročilé imunoanalytické metody umožňují stanovení

koncentrací celkového tau proteinu i vybraných proteoformů v biologických tekutinách. Existuje bohatá literatura dokumentující zvýšení koncentrací celkového tau proteinu a některých fosforylovaných proteoformů v MMM a plazmě/séru u různých neuropatologických stavů. Celkový tau protein i jeho fosforylované formy (především pT181-tau protein) již našly klinické uplatnění v diagnostice AN a jejich stanovení v MMM je hrazeno pojišťovnou. Nově se vyvíjejí i metody pro stanovení tau proteinů v plazmě/séru. Po jejich zavedení do klinické praxe by mohly představovat značný přínos pro pacienty i lékaře, neboť odběr krve se obejde bez invazivního výkonu lumbální punkce.

Seznam zkratk

AN	Alzheimerova nemoc
CNS	centrální nervový systém
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
MMM	mozkomíšni mok
PNS	periferní nervový systém
p-tau	fosforylovaný tau protein
pT181-tau protein	tau protein fosforylovaný na threoninovém zbytku 181
pT217-tau protein	tau protein fosforylovaný

pT231-tau protein	na threoninovém zbytku 217 tau protein fosforylovaný
t-tau	na threoninovém zbytku 231 celkový tau protein
SIMOA	single molecule array

Tento výstup vznikl v rámci programu Cooperatio, vědní oblasti Lékařská diagnostika a základní lékařské vědy a byl podpořen MZ ČR RVO VFN 64165.

LITERATURA

- Weingarten M. D., Lockwood A. H., Hwo S. Y., Kirschner M. W.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **72**, 1858 (1975).
- Gozes I.: *EPMA J.* **1**, 305 (2010).
- Grundke-Iqbal I., Iqbal K., Quinlan M., Tung Y. C., Zaidi M. S., Wisniewski H. M.: *J. Biol. Chem.* **261**, 6084 (1986).
- Zetterberg H.: *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **43**, 194 (2017).
- Kaerst L., Kuhlmann A., Wedekind D., Stoeck K., Lange P., Zerr I.: *J. Neurol.* **260**, 2722 (2013).
- Hoiland R. L., Rikhray K. J. K., Thiara S., Fordyce C., Kramer A. H., Skrifvars M. B., Wellington C. L., Griesdale D. E., Fergusson N. A., Sekhon M. S.: *JAMA Neurol.* **79**, 390 (2022).
- Harten A., Kester M., Visser P., Blankenstein M., Pijnenburg Y., Flier W., Scheltens P.: *Clin. Chem. Lab. Med.* **49**, 353 (2011).
- Fialova L., Bartos A., Svarcova J.: *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.* **161**, 286 (2017).
- Di Stefano A. a 10 spoluautorů: *CNS Spectr.* **25**, 402 (2020).
- Fialová L., Zima T., Bartoš A.: *Chem. Listy* **114**, 537 (2020).
- Boroň J., Novotný P., Kačer P.: *Chem. Listy* **110**, 792 (2016).
- Neve R. L., Harris P., Kosik K. S., Kurmit D. M., Donlon T. A.: *Brain Res.* **387**, 271 (1986).
- Couchie D., Mavilia C., Georgieff I. S., Liem R. K., Shelanski M. L., Nunez J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 4378 (1992).
- Buee L., Bussiere T., Buee-Scherrer V., Delacourte A., Hof P. R.: *Brain Res. Rev.* **33**, 95 (2000).
- Mandelkow E. M., Mandelkow E.: *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**, a006247 (2012).
- Wang Y., Mandelkow E.: *Nat. Rev. Neurosci.* **17**, 5 (2016).
- Guo T., Noble W., Hanger D. P.: *Acta Neuropathol.* **133**, 665 (2017).
- Alquezar C., Arya S., Kao A. W.: *Front. Neurol.* **11**, 595532 (2021).
- Quinn J. P., Corbett N. J., Kellett K. A. B., Hooper N. M.: *J. Alzheimer's Dis.* **63**, 13 (2018).
- Wegmann S., Biernat J., Mandelkow E.: *Curr. Opin. Neurobiol.* **69**, 131 (2021).
- Köpke E., Tung Y.-C., Shaikh S., Alonso A. C., Iqbal K., Grundke-Iqbal I.: *J. Biol. Chem.* **268**, 24374 (1993).
- Johnson G. V. W., Stoothoff W. H.: *J. Cell Sci.* **117**, 5721 (2004).
- Grundke-Iqbal I., Iqbal K., Tung Y. C., Quinlan M., Wisniewski H. M., Binder L. I.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 4913 (1986).
- Meredith J. E., Jr. a 12 spoluautorů: *PLoS One* **8**, e76523 (2013).
- Cicognola C. a 15 spoluautorů: *Acta Neuropathol.* **137**, 279 (2019).
- Sato C. a 16 spoluautorů: *Neuron* **97**, 1284 (2018).
- Bukar Maina M., Al-Hilaly Y. K., Serpell L. C.: *Biomolecules* **6**, 9 (2016).
- Perez M., Avila J., Hernandez F.: *Front. Neurosci.* **13**, 698 (2019).
- Avila J., Simón D., Díaz-Hernández M., Pintor J., Hernández F.: *J. Alzheimer's Dis.* **40** Suppl 1, S7 (2014).
- Yamada K. a 10 spoluautorů: *J. Neurosci.* **31**, 13110 (2011).
- Merezhko M., Uronen R.-L., Huttunen H.: *Front. Mol. Neurosci.* **13**, (2020). doi: 10.3389/fnmol.2020.569818.
- Kawata K., Liu C. Y., Merkel S. F., Ramirez S. H., Tierney R. T., Langford D.: *Neurosci. Biobehav. Rev.* **68**, 460 (2016).
- Pase M. P., Beiser A. S., Himali J. J., Satizabal C. L., Aparicio H. J., DeCarli C., Chêne G., Dufouil C., Seshadri S.: *JAMA Neurol.* **76**, 598 (2019).
- Onatsu J. a 11 spoluautorů: *In Vivo* **34**, 2577 (2020).
- Ding X., Zhang S., Jiang L., Wang L., Li T., Lei P.: *Transl. Neurodegener.* **10**, (2021). doi: 10.1186/s40035-021-00234-5.
- Wang J., Li J., Han L., Guo S., Wang L., Xiong Z., Chen Z., Chen W., Liang J.: *Exp. Ther. Med.* **11**, 1147 (2016).
- Gleerup H. S., Hasselbalch S. G., Simonsen A. H.: *Dis. Markers* **2019**, 4761054 (2019).
- Gijs M., Ramakers I. H. G. B., Visser P. J., Verhey F. R. J., van de Waarenburg M. P. H., Schalkwijk C. G., Nuijts R. M. M. A., Webers C. A. B.: *Sci. Rep.* **11**, 22675 (2021).
- Passali G., Politi L., Crisanti A., Loglisci M., Anzivino R., Passali D.: *Chem. Percept.* **8**, 201 (2015).
- Václavková J., Oždian T., Hajdúch M., Džubák P.: *Chem. Listy* **114**, 209 (2020).
- Hu X., Yang Y., Gong D.: *Neurol. Sci.* **38**, 1953 (2017).
- Blennow K. a 18 spoluautorů: *Brain* **143**, 650 (2020).
- Chen Z. a 16 spoluautorů: *Alzheimer's Dement.* **15**, 487 (2019).
- Bartoš A., Brůžová M., Fialová L.: *Cesk. Slov. Neurol. N.* **85**, 511 (2022).
- Holper S., Watson R., Yassi N.: *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 7307 (2022). doi: 10.3390/ijms23137307.
- Momtazmanesh S., Shobeiri P., Saghazadeh A.,

- Teunissen C. E., Burman J., Szalardy L., Klivenyi P., Bartos A., Fernandes A., Rezaei N.: *Rev. Neurosci.* 32, 573 (2021).
47. Olsson B. a 14 spoluautorů: *Lancet Neurol.* 15, 673 (2016).
48. Bruzova M., Rusina R., Stejskalova Z., Matej R.: *Sci. Rep.* 11, 10837 (2021).
49. Zetterberg H., Blennow K.: *Mol. Neurodegener.* 16, 10 (2021).
50. Jack C. R., Jr. a 19 spoluautorů: *Alzheimer's Dement.* 14, 535 (2018).
51. Suárez-Calvet M.: *EBioMedicine* 77, 103936 (2022).
52. Bartoš A., Čechová L., Švarcová J., Řičný J., Řípková D.: *Cesk. Slov. Neurol. N.* 75/108, 587 (2012).
53. Barthélemy N. R., Bateman R. J., Hirtz C., Marin P., Becher F., Sato C., Gabelle A., Lehmann S.: *Alzheimer's Res. Ther.* 12, 26 (2020).
54. Janelidze S. a 16 spoluautorů: *Nat. Commun.* 11, 1683 (2020).
55. Barthélemy N. R., Mallipeddi N., Moiseyev P., Sato C., Bateman R. J.: *Front. Aging Neurosci.* 11, 121 (2019).
56. Johnson G. V., Seubert P., Cox T. M., Motter R., Brown J. P., Galasko D.: *J. Neurochem.* 68, 430 (1997).
57. Chesser A. S., Pritchard S. M., Johnson G. V.: *Front. Neurol.* 4, 122 (2013).
58. Guix F. X. a 11 spoluautorů: *Int. J. Mol. Sci.* 19, 663 (2018).
59. Sengupta U., Portelius E., Hansson O., Farmer K., Castillo-Carranza D., Woltjer R., Zetterberg H., Galasko D., Blennow K., Kaye R.: *Ann. Clin. Transl. Neurol.* 4, 226 (2017).
60. Xu M., Lu M., Zhang W., Jin Q., Chen Y.: *J. Proteome Res.* 20, 2299 (2021).
61. Scholl M., Maass A., Mattsson N., Ashton N. J., Blennow K., Zetterberg H., Jagust W.: *Mol. Cell. Neurosci.* 97, 18 (2019).
62. Mattsson N. a 16 spoluautorů: *Neurology* 87, 1827 (2016).
63. Fossati S. a 10 spoluautorů: *Alzheimer's Dement.* 11, 483 (2019).
64. Verde F.: *J. Neural. Transm.* 129, 239 (2022).
65. Bogoslovsky T. a 10 spoluautorů: *J. Neurotrauma* 34, 66 (2017).
66. Humaloja J. a 11 spoluautorů: *Resuscitation* 170, 141 (2022).
67. De Vos A. a 10 spoluautorů: *BMC Neurology* 17, 170 (2017).
68. Janelidze S. a 14 spoluautorů: *Nat. Med.* 26, 379 (2020).
69. Kolarova M., Sengupta U., Bartos A., Ricny J., Kaye R.: *J. Alzheimer's Dis.* 58, 471 (2017).
70. Ashton N. J., Ide M., Zetterberg H., Blennow K.: *Neurol. Ther.* 8, 83 (2019).
71. Wang Y. a 10 spoluautorů: *Mol. Neurodegener.* 12, 5 (2017).
72. Fiandaca M. S. a 10 spoluautorů: *Alzheimer's Dement.* 11, 600 (2015).
73. Deters K. D. a 10 spoluautorů: *J. Alzheimer's Dis.* 58, 1245 (2017).
74. Bergman L., Zetterberg H., Kaihola H., Hagberg H., Blennow K., Åkerud H.: *PLoS One* 13, e0196025 (2018).
75. Zerr I., Villar-Piqué A., Hermann P., Schmitz M., Vargas D., Ferrer I., Riggert J., Zetterberg H., Blennow K., Llorens F.: *Alzheimer's Res. Ther.* 13, 86 (2021).
76. Huang S., Wang Y. J., Guo J.: *Neurosci. Bull.* 38, 677 (2022).
77. Teunissen C. E., Verberk I. M. W., Thijssen E. H., Vermunt L., Hansson O., Zetterberg H., van der Flier W. M., Mielke M. M., Del Campo M.: *Lancet Neurol.* 21, 66 (2022).

L. Fialová^{a,b}, L. Nosková^a, and T. Zima^a (^a*First Faculty of Medicine, Charles University, General University Hospital in Prague,* ^b*Faculty of Biomedical Engineering, Czech Technical University in Prague, Czech Republic*): **Tau Protein in Biological Fluids and Its Clinical Value**

The tau protein is one of the neurocytoskeletal proteins that participate in the pathogenesis of serious neurological diseases, especially Alzheimer's disease. The tau protein is characterized by considerable structural variability, which is reflected in the existence of its numerous proteoforms. This review aims to provide brief information on the structure of tau protein and its proteoforms, which seem promising biomarkers for clinical use. Biological fluids, suitable for laboratory examination in clinical practice, i.e., cerebrospinal fluid and blood (plasma/serum), are discussed. Total tau protein and its phosphorylated forms (mainly the pT181-tau protein, phosphorylated at the threonine residue 181) have already found clinical application in diagnosis of Alzheimer's disease.

Keywords: tau protein, proteoforms, post-translational modification, phosphorylation, proteolysis, Alzheimer's disease, cerebrospinal fluid, blood

Acknowledgement

This work was supported by the Cooperatio Program, research area Medical Diagnostics and Basic Medical Sciences and by MH CZ DRO VFN 64165 (given by the Czech Ministry of Health).



Užití tohoto díla se řídí mezinárodní licencí Creative Commons Attribution License 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.cs>), která umožňuje neomezené využití, distribuci a kopírování díla pomocí jakéhokoliv média, za podmínky řádného uvedení názvu díla, autorů, zdroje a licence.

IDENTIFIKACE BUNĚČNÝCH CÍLŮ AKTIVNÍCH LÁTEK POMOCÍ MIKROSKOPICKÝCH METOD A FLUORESCENČNÍCH SOND

JARMILA STANKOVÁ, MARIÁN HAJDÚCH a PETR DŽUBÁK

Ústav molekulární a translační medicíny, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, Hněvotínská 5, 779 00 Olomouc 9, Česká republika
jarmila.stankova@upol.cz a petr.dzubak@upol.cz

Došlo 3.11.23, přijato 3.1.24.

Identifikace buněčných cílů aktivních látek má zásadní význam pro optimalizaci léčiv a minimalizaci jejich nežádoucích vedlejších účinků. Komplexní povaha biologických systémů ztěžuje tuto identifikaci, ale mikroskopické metody, zejména fenotypové testování, reprezentované metodou „Cell Painting“, představují cenný nástroj pro pochopení vlivu látek na úrovni buněk a organel. Tyto metody umožňují rychlé testování rozsáhlých knihoven látek a nabízejí unikátní pohled na mechanismus jejich účinku pozorováním chování buněk, pomocí hodnocení jejich morfologie, pohyblivosti, dělení a migrace. Mikroskopie živých buněk čelí výzvám, jako je fototoxicita, což vyžaduje pečlivý výběr fluorescenčních značek a optimalizaci podmínek. Mezi syntetickými fluorescenčními sondami pro mikroskopii živých buněk vynikají BODIPY barviva se svou syntetickou univerzálností a fotofyzikálními vlastnostmi, které zajišťují minimální poškození vzorku během biozobrazování.

Klíčová slova: buněčný cíl, mechanismus účinku, mikroskopie, fluorofory, BODIPY

Obsah

1. Úvod
2. Fenotypové testování
 - 2.1. Fluorescenční sondy používané při fenotypovém testování
3. Mikroskopie živých buněk
 - 3.1. Fluorescenční sondy vhodné pro mikroskopii živých buněk
4. Závěr

1. Úvod

Objevení molekulárního cíle aktivních látek je „svatým grálem“ a mnohdy zásadním krokem ve vývoji léčiv, přičemž v důsledku vede k pochopení jejich mechanismu účinku. Tyto informace jsou nezbytné pro optimalizaci účinnosti léků a minimalizaci nežádoucích vedlejších účinků. Znalost cíle umožňuje lepší terapeutické zacílení léčiva, optimalizaci klinických studií a vede k ideálu personalizované medicíny. Kromě toho, identifikace nových molekulárních cílů pro existující léčiva může vést k jejich použití v nových terapeutických indikacích, a to v mnohem kratším časovém horizontu než při zcela novém vývoji léčiva. Zacílením vývoje léčiva také dochází ke zefektivnění celého procesu, a tím i ke snížení nákladů na čas a zdroje potřebné k uvedení konkrétního léku na trh¹. Do

vývoje léčiv se přitom investují nemalé prostředky. Bez ohledu na dostupné finanční zdroje může být identifikace molekulárního cíle v kontextu vývoje léčiv náročná z několika objektivních důvodů. Biologické systémy jsou složité a často zahrnují síť vzájemně propojených drah a molekul. Potenciální lék může v různé míře, s různou specificitou a afinitou, interagovat s více cíli, jak žádoucími, tak i nežádoucími (off-target), v různých tkáních nebo buněčných kontextech. Mnoho cílů jsou proteiny, které fungují jako součást větších komplexů nebo nepřímo interagují s jinými proteiny v buněčných drahách. Některá léčiva fungují prostřednictvím nekonvenčních mechanismů, jako je modulace konformace proteinů a interakce s DNA a RNA, jejichž identifikace pomocí tradičních metod může být náročná². Mikroskopické metody, které jsou klíčové pro zobrazování buněk a subcelulárních organel, hrají zásadní roli při identifikaci cílů biologicky aktivních látek. Tyto metody, včetně technik jako fluorescenční a elektronová mikroskopie, jsou neocenitelnými nástroji pro studium účinků látek na buněčné struktury a organel³. Tyto látky totiž mohou vyvolat velmi specifické změny jak na buněčné úrovni, tak na úrovni organel. Mohou například způsobit kondenzaci chromatinu a fragmentaci jádra, změnit distribuci cytoplasmy a vést k nabobtnání a přestavbě mitochondrií. Podle těchto změn můžeme usuzovat na specifický mechanismus účinku látky⁴.

2. Fenotypové testování

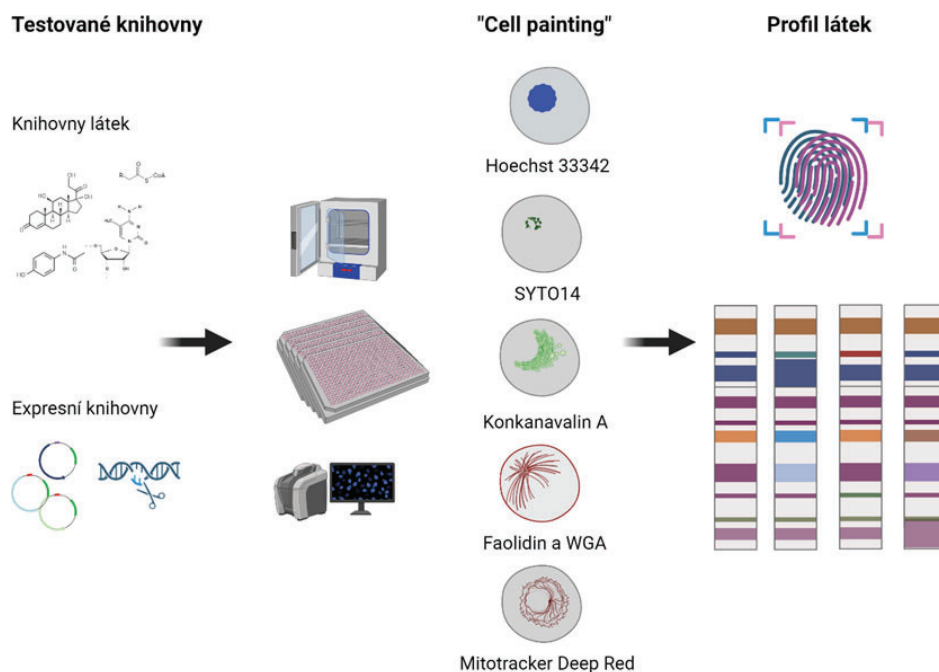
Velmi zajímavým přístupem pro hledání mechanismu účinku a molekulárního cíle je fenotypové testování, které analyzuje sloučeniny z hlediska jejich účinku na fenotyp, a to jak na buněčné úrovni, tak i na úrovni celého organismu⁵. Takové testování často začíná výběrem vhodného buněčného modelu a testovacího systému. Většinou jsou potom buňky vystaveny knihovně malých molekul, přírodních produktů nebo jiných aktivních látek a potom pozorujeme a analyzujeme změny jejich fenotypu. Fenotypem se rozumí změny buněčné morfologie, růstu, expresních vzorů, nebo přítomnost specifických markerů⁶. Schéma fenotypového testování je uvedeno na obr. 1.

Při zapojení platformy pro vysokopropustné testování do fenotypového testování⁷ (High-Throughput Screening, HTS) můžeme v relativně krátkém čase sledovat/detekovat účinek velkého souboru potenciálních sloučenin (knihoven), přičemž testy probíhají v miniaturizovaných podmínkách a automatických režimech. Jedním z nejrychlejších a nejméně invazivních způsobů fenotypového hodnocení stavu buněk je automatická mikroskopie^{4,8}. Celý proces může být robotizován a produkovat obrovské množství mikroskopických obrazů buněk ovlivněných konkrétními látkami v různých časových bodech. Takový přístup poskytuje velmi komplexní data pro identifikaci cíle. Stávající metody jsou obvykle založeny na fluorescenční mikroskopii, která poskytuje velmi přehledné

snímky, které lze snadno segmentovat a automaticky vyhodnocovat relativně jednoduchými metodami⁹.

Nejrozšířenější fenotypovou HTS metodou je „Cell Painting“¹⁰ vyvinutý výzkumnou skupinou Anne Carpenterové v roce 2016. Tato metoda je založena na barvení buněk kombinací specifických fluorescenčních barviv pro zachycení detailních informací o různých buněčných strukturách a procesech. Takový multiparametrický přístup poskytuje holistický pohled na morfologii a funkci buňky. Po ošetření buněk testovanými látkami dochází k jejich fixaci a barvení. V originálním protokolu je fluorescenčně barveno jádro a jadérko, cytoskelet, endoplasmatické retikulum, Golgiho aparát, mitochondrie a plasmatická membrána. Výběr jiného setu fluorescenčních sond dle požadavku na testování určitého cíle je možný, ale pak přicházíme o výhodu porovnatelnosti s původními daty. Na získaných snímcích se následně provádí výpočetní analýza, která generuje kvantitativní data číselně vyjadřující různé obrazové charakteristiky analyzovaných buněk, se kterými je možné dále pracovat. Výstupem je sestavení pomyslných otisků prstů specifických pro testované látky, tedy jejich profilů, které se dále porovnávají s profily získanými testováním standardů nebo látek s požadovanými vlastnostmi. Pokud je v nich významná shoda, můžeme usuzovat na společný mechanismus biologického účinku.

Nedávným příkladem úspěšného fenotypového testování je studie Baillache a spol.¹¹, kde byly identifikovány



Obr. 1. Schéma fenotypového testování

pyrazolopyrimidiny, které selektivně inhibují CSF-1R kinasu u glioblastomových buněk.

2.1. Fluorescenční sondy používané při fenotypovém testování

Fluorescenční sondy jsou relativně malé molekuly, které obsahují skupiny detekovatelné na základě vnitřní chemické vlastnosti – fluorescence. Fluorescenční molekuly mají schopnost absorbovat energii fotonů v jedné vlnové délce a následně ji vyzářit v jiné vlnové délce. Dále sondy obsahují reaktivní skupinu schopnou se vázat na funkční biomolekuly. Používané fluorescenční sondy by měly dosahovat vysokých kvantových výtěžků a také mít dostatečně posunutý emisní spektrum, aby byla zajištěna izolace detekovaného signálu¹². Většina používaných fluoroforů obsahuje systém aromatických kruhů a přítomnost donátorových skupin nejčastěji v *ortho*- a *para*-polohách může zvýšit kvantový výtěžek. Naopak přítomnost elektronegativní skupiny kvantový výtěžek snižuje. Dalším potenciálním substituentem s velkým vlivem na fluorescenci jsou těžké atomy. Aromatické kruhy obsahující těžké atomy mají typicky nižší kvantový výtěžek¹³. Nejčastěji používané fluorescenční struktury jsou ve vodě rozpustné deriváty cyaninu, fluoresceinu, rhodaminu a kumarinu¹⁴. Fluorescenční sondy jsou klíčové pro fenotypové testování a mohou být vhodné k barvení fixovaných buněk s permeabilizovanou membránou¹⁵, nebo je možné použít kombinovaný přístup, kdy se barví živé buňky, které jsou následně fixovány a dobarvovány dalšími barvivy, které by bez fixace nepronikly buněčnou membránou¹⁶. Důležitou součástí původního protokolu dle Carpenterové¹⁰ je použití specifických fluorescenčních barviv, jejichž charakteristiky jsou podrobněji popsány níže a shrnuty v tab. I.

Hoechst 33342 patří do rodiny bisbenzimidových barviv a používá se k značení buněčných jader. Specificky se váže na DNA, zejména do míst bohatých na adenin a thymin¹⁷. Název „Hoechst“ pochází od německého výrobce barviv Hoechst AG, který tato barviva původně vyvinul a prodával. Hoechst 33342 proniká přes buněčnou

a jadernou membránu, což znamená, že může snadno proniknout i do živých buněk a díky tomu je použitelný pro barvení jader fixovaných i živých buněk. Kromě mikroskopických metod ho lze použít i pro průtokovou cytometrii¹⁸.

Konkanavalin A (ConA) je lektin, tedy typ proteinu, který se může vázat na specifické sacharidové struktury. ConA pochází ze semen tropické bobovité rostliny *Canavalia ensiformis* a je široce používán v buněčné biologii díky své schopnosti selektivně se vázat na α -mannosylové a α -glukosylové zbytky na glykoproteinech a glykolipidech, včetně buněčných membrán endoplasmatického retikula¹⁹. Tato vazba je závislá na iontech Ca^{2+} a vazebné místo je na každé ze čtyř podjednotek tetrameru tohoto lektinu. ConA je aktivní mitogen a v buněčné a molekulární biologii se používá ke stimulaci lymfocytů²⁰. Může být konjugován s fluorofory a poté se používá pro metody fluorescenční mikroskopie²¹ nebo průtokové cytometrie²², kdy značí buňky na základě složení povrchových glykoproteinů. ConA se také používá v biochemických purifikačních a chromatografických technikách²³, může být imobilizován na pevných nosičích a použit k separování a izolaci glykoproteinů nebo glykolipidů z komplexních směsí. Vazebná afinita lektinu může být ovlivněna různými typy glykosylace přítomnými na buněčném povrchu.

SYTO 14 patří do rodiny barviv SYTO, což jsou buněčná permeabilní barviva, vázající se na nukleové kyseliny. Tato barviva se často používají k detekci apoptózy u živých buněk, protože jsou netoxická. Při snížené fluorescenci sledujeme rozklad nukleových kyselin a detekce mikroparticulí značí poškození membrány u aktivovaných a apoptických buněk^{24–26}. SYTO 14 barví konkrétně RNA a může být použito jak ve fluorescenční mikroskopii²⁵, tak v průtokové cytometrii²⁶.

Faloidin je cyklický heptapeptid patřící do skupiny falotoxinů, který pochází ze smrtelně jedovaté houby muchomůrky zelené (*Amanita phalloides*). Faloidin se selektivně váže na filamentární aktin (F-aktin), hlavní složku eukaryotického cytoskeletu. Po navázání zabraňuje depolymeraci aktinových filamentů a stabilizuje jejich strukturu²⁷. Faloidin je často konjugován s fluorofory (jako jsou barviva FITC nebo AlexaFluor) za účelem vizualizace

Tabulka I
Fluorescenční barviva používaná pro „cell painting assay“¹⁰

Barvivo	Filtr pro excitaci [nm]	BP Filtr pro emisi [nm]	Buněčná struktura
Hoechst 33342	405	447/60	DNA, značení buněčných jader
ConA Konjugát s AlexaFluor 488	488	536/40	endoplazmatické retikulum
SYTO 14	488	593/40	jadérka, cytoplazmatická RNA
Faloidin Konjugát s AlexaFluor 568	561	624/40	F-aktin a cytoskelet
WGA Konjugát s AlexaFluor 555	561	624/40	Golgiho aparát a cytoplazmatická membrána
Mitotracker Deep Red	640	692/40	mitochondrie

aktinového cytoskeletu pomocí fluorescenční mikroskopie²⁸. Zatímco faloidin se typicky používá ve fixovaných buňkách, existují deriváty, které byly vyvinuty pro zobrazování živých buněk²⁹. Tyto deriváty jsou méně toxické a umožňují pozorovat dynamické změny v aktinovém cytoskeletu v průběhu času. Kromě mikroskopie lze faloidin použít v průtokové cytometrii ke kvantifikaci a analýze obsahu F-aktinu v buňkách³⁰.

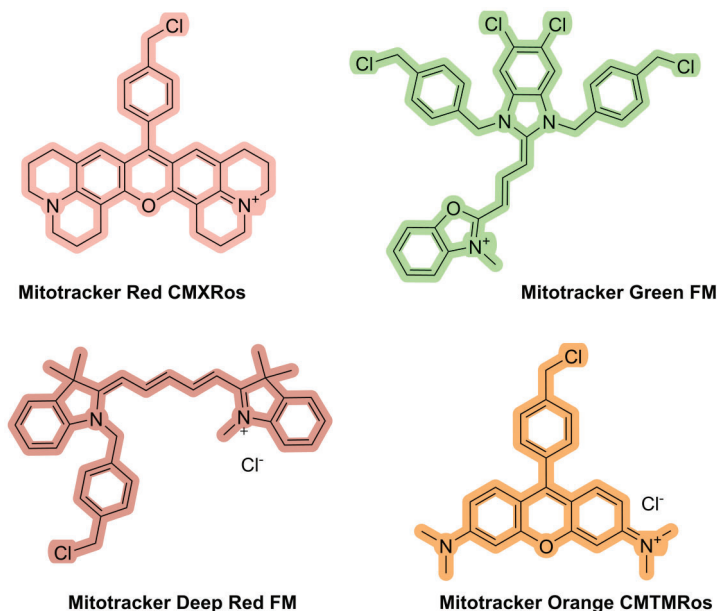
WGA (Wheat Germ Agglutinin) pochází z pšeničných klíčků a je široce používán v biologickém a biochemickém výzkumu pro svou schopnost selektivně se vázat na rezidua *N*-acetylglukosaminu a kyseliny sialové na glykoproteinech a glykolipidech³¹. Pokud je konjugován s fluoroforem, může být použit k vizualizaci a studiu buněčné membrány ve fluorescenční mikroskopii³². Dále ho lze použít v průtokové cytometrii k selektivnímu značení a třídění buněk na základě obsahu povrchových glykoproteinů³³. WGA se používá v biochemických a molekulárně biologických technikách pro afinitní čištění glykoproteinů³⁴. Využitím jeho vazebné specifity lze izolovat glykoproteiny pro další analýzu³⁵.

Mitotracker barviva jsou skupinou fluorescenčních sond používaných v buněčné biologii k značení a sledování mitochondrií v živých buňkách, přičemž některá z nich jsou stabilní i po jejich fixaci³⁶. Tato barviva jsou užitečná ke studiu morfologie, dynamiky a funkce mitochondrií prostřednictvím různých zobrazovacích technik, jako je fluorescenční mikroskopie a průtoková cytometrie³⁷. Mitotracker barviva jsou navržena tak, aby se selektivně akumulovala v aktivních mitochondriích. Jejich selektivní akumulace je závislá na potenciálu mitochondriální mem-

brány a tato vlastnost je neocenitelná pro hodnocení změn v mitochondriálním membránovém potenciálu, který je klíčovým indikátorem mitochondriální funkce³⁸. Mitotracker barviva díky své dostupnosti v různých barvách (např. červená – Mitotracker Red CMXRos, zelená – Mitotracker Green FM, tmavě červená – Mitotracker Deep Red FM a oranžová – Mitotracker Orange CMTMRos; chemické struktury zobrazeny na obr. 2) poskytují vysokou flexibilitu při přípravě vícebarevných fluorescenčních experimentů.

3. Mikroskopie živých buněk

Zobrazení živých buněk je zásadní pro studium dynamických procesů v reálném čase, což umožňuje detailní sledování účinků látky na chování buněk, včetně vlivu na buněčnou motilitu, dělení, migraci, změny tvaru a organel. Některé aktivní látky mají rychlé a dynamické účinky na buněčné procesy³⁹. Časověná mikroskopie nabízí možnost dlouhodobého sledování, čímž odhaluje časovou dynamiku buněčných změn, funkce a morfologie subcelulárních struktur vyvolaných působením studované látky. Na druhou stranu má mikroskopie živých buněk několik výzev, mezi které patří fototoxicita a díky tomu i omezení frekvence snímání v čase. Proto je důležité věnovat pozornost volbě vhodných fluorescenčních značek a optimalizaci experimentálních podmínek⁴⁰. Studium kolokalizace látky s buněčnými složkami nebo organelami, případně proteinovými komplexy pomocí FRET (Försterův rezonanční přenos energie) techniky, může poskytnout cenné informace o potenciálních interakcích s cíli⁴¹. Označením



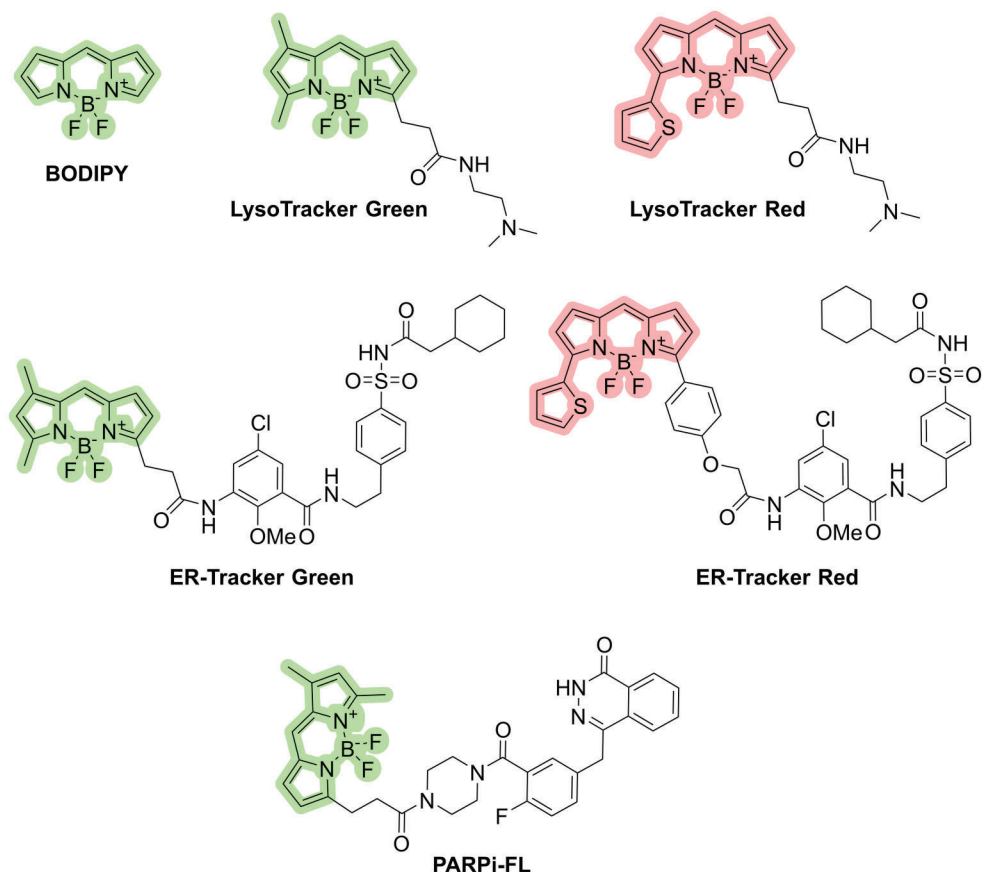
Obr. 2. Molekulární struktury Mitotracker barviv

látky a potenciálního cílového proteinu fluorofory, z nichž jeden je aktivovaný pouze při přenosu energie, můžeme při změně ve fluorescenčním signálu usuzovat na jejich těsnou blízkost, a tedy vzájemnou interakci⁴².

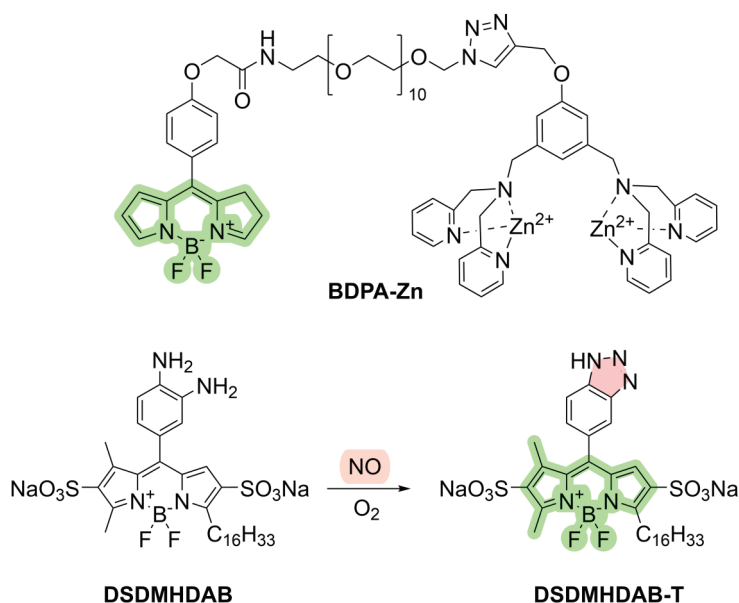
3.1. Fluorescenční sondy vhodné pro mikroskopii živých buněk

Pro mikroskopii živých buněk se často používají různé fluorescenční sondy. Tradičně používané fluorescenční proteiny, spojené s cílovými proteiny nebo peptidy, mohou negativně ovlivnit funkci takto fúzovaného proteinu. Proto se k překonání těchto problémů využívají syntetické sondy založené na malých chemických molekulách, které nabízejí menší velikost, možnosti jednoduchých syntetických úprav i optimalizaci a využití různých spektrálních charakteristik⁴³. Mezi ideální luminofory pro tyto účely patří BODIPY (z angl. boron-dipyromethene) barviva, jejichž intenzivní a zářivé barvy, vysoká molární absorptivita a široký rozsah fluorescenční emise jsou ideální pro fluorescenční mikroskopii, průtokovou cytometrii a biozobrazování *in vivo*. BODIPY barviva jsou často využívána pro detekci a monitorování biologických procesů, včetně interakci protein-protein, enzymové aktivity, případně buněčné

lokalizace. Strukturální modifikace těchto barviv umožňuje regulaci jejich klíčových charakteristik⁴⁴. Prvním komplexem, který byl publikován v roce 1968, je 4,4-difluor-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen⁴⁵ (struktura uvedena na obr. 3). Mimo experimentálně připravené sondy s BODIPY je několik dostupných i komerčně, například **LysoTracker** a **ER-Tracker**⁴³. Struktury komerčních sond jsou zobrazeny na obr. 3. Příkladem využití komerční BODIPY sondy je **PARPi-FL**, fluorescenční sonda založená na BODIPY a olaparibu (inhibitor poly(ADP-ribosa) polymerasy 1 (PARP1), která se ukázala jako slibná při detekci a hodnocení chirurgických okrajů epiteliálních karcinomů v klinických podmínkách^{46,47}. Fluorescenční vlastnosti BODIPY lze navíc rozšířit do téměř infračervené oblasti zavedením atomů dusíku do pyrrolové kostry (aza-BODIPY)⁴⁸, nebo rozšířením konjugovaného systému⁴⁹. V poslední době přitahují takové fluorofory pozornost díky tomu, že umožňují biozobrazování se sníženou autofluorescencí a rozptylem světla, navíc snižují poškození či ztrátu fluorescence (photobleaching) způsobené excitací fluoroforu⁵⁰. BODIPY sondy mohou být využívány i pro pokročilé mikroskopické techniky, jako je superrezoluční mikroskopie. Ve studii Adhikari a spol.⁵¹, byla využita tvorba dimerů s posunem emitujícího světla do



Obr. 3. Molekulární struktura 4,4-difluor-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacenu a komerčních sond LysoTracker, ER-Tracker a PARPi-FL



Obr. 4. Molekulární struktury experimentálních sond BDPDA-Zn a DSDMHDAB

červené oblasti spektra. Takto byly ve vysokém rozlišení lokalizována jednotlivá analoga mastných kyselin v membráně živých kvasinek pomocí mikroskopické metody lokalizace jednotlivých molekul (Single Molecule Localization Microscopy – SMLM). Další práce využila BODIPY sondy pro super-rezoluční techniku fotoaktivní lokalizační mikroskopie (PhotoActivated Localization Microscopy, PALM). Tato metoda se opírá o stochastickou excitaci fluorescenčních molekul, kdy je aktivována jen malá podmnožina fluorescenčních značek, což umožňuje jejich individuální lokalizaci s vysokým rozlišením. Po nasnímání velkého množství snímků jsou tyto snímky kombinovány do jednoho vysokorozlišovacího obrazu, kdy po obrazové rekonstrukci můžeme dosáhnout zobrazení biologických vzorků v rozlišení až téměř na molekulární úrovni 10 nm (cit.⁵²). Kromě toho mohou být do výsledných fotoaktivovatelných fluoroforů začleněny cílené ligandy pro označení vybraných subcelulárních složek v živých buňkách^{53–55}. Díky svému lipofilnímu charakteru se BODIPY uplatňuje při syntéze sond pro značení plasmatických membrán⁵⁶. Struktury experimentálně připravených sond jsou na obr. 4. Například sonda **BDPDA-Zn** byla vytvořena na základě BODIPY a zinkového komplexu, který specificky váže fosfatidylserin v plasmatické membráně. Slouží k rozlišení stupně apoptózy, protože se selektivně váže na membránu časných apoptotických buněk a internalizuje se do pozdních apoptotických buněk⁵⁷. Dále byla vytvořena amfifilní sonda **DSDMHDAB** pro vizualizaci extracelulárního uvolňování oxidu dusnatého na membráně pomocí *in situ* cyklické reakce BODIPY obsahujícího 3,4-diaminofenylovou skupinu⁵⁸.

4. Závěr

Využití pokročilých technologií, jako jsou HTS a fenotypové testování, zásadně usnadnilo objevování cílů biologicky aktivních látek². Je však důležité si uvědomit, že proces identifikace cílů těchto látek zůstává komplexním a neustále se vyvíjejícím aspektem výzkumu a vývoje léčiv, zejména v kontextu nových terapeutických přístupů a personalizované medicíny. Jako každý technologický přístup, mikroskopické metody přinášejí řadu výhod, včetně přímé vizualizace buněčných struktur, sledování procesů v reálném čase a určení prostorové subcelulární lokalizace cílových míst působení testovaných látek. Pokročilé mikroskopické techniky s vysokým rozlišením nabízí detailní snímky, které umožňují odhalit i velmi jemné nuance interakcí mezi látkami a jejich molekulárními cíli^{3,59}. Na druhou stranu, tyto metody mohou být technicky náročné^{3,59}, vyžadují specializované vybavení a odborné znalosti v oblasti přípravy vzorků a zejména analýzy dat. Mikroskopie může vést k falešně pozitivním nebo negativním výsledkům, zejména pokud procesy značení a barvení nejsou pečlivě optimalizovány a pokud použitá barviva nejsou dostatečně selektivní a specifická. BODIPY barviva jsou ideální pro mikroskopii, nabízejí intenzivní barvy a různé spektrální charakteristiky. Možnost modifikace struktury BODIPY umožňuje regulaci klíčových vlastností. Jejich využití v mikroskopických technikách super-rezoluce, jako je SMLM nebo PALM, umožňuje biozobrazování s vysokým prostorovým rozlišením. BODIPY sondy jsou významným nástrojem pro studium živých buněk s minimalizací poškození vzorku.

Tento výzkum byl podpořen infrastrukturním grantem Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR (EATRIS-CZ – LM2023053 a CZ-OPENSUREEN LM2023052), programem EXCELES, ID projektu č. LX22NPO5102, státní podporou Technologické agentury ČR v rámci programu Národní centra kompetence (TN02000109) a interním grantem Univerzity Palackého v Olomouci (IGA_LF_2023_025).

LITERATURA

- Davis R. L.: *iScience* 23, 101487 (2020).
- Tautermann C. S., v knize: *Quantum Mechanics in Drug Discovery* (Heifetz A., ed.), kap. 1, str. 1. Humana New York, NY 2020.
- Bullen A.: *Nat. Rev. Drug Discovery* 7, 54 (2008).
- Wang Y., Zhao X. P., Gao X. M., Nie X. J., Yang Y. X., Fan X. H.: *Anal. Chim. Acta* 702, 87 (2011).
- Stossi F., Singh P. K., Safari K., Marini M., Labate D., Mancini M. A.: *Biochem. Pharmacol.* 216, 115770 (2023).
- Isgut M., Rao M., Yang C. H., Subrahmanyam V., Rida P. C. G., Aneja R.: *Med. Res. Rev.* 38, 504 (2018).
- Menduti G., Boido M.: *Int. J. Mol. Sci.* 24, 14689 (2023).
- Abu-Abied M., Avisar D., Belausov E., Holdengreber V., Kam Z., Sadot E.: *Protoplasma* 236, 3 (2009).
- Lang P., Yeow K., Nichols A., Scheer A.: *Nat. Rev. Drug Discovery* 5, 343 (2006).
- Bray M. A., Singh S., Han H., Davis C. T., Borgeson B., Hartland C., Kost-Alimova M., Gustafsdottir S. M., Gibson C. C., Carpenter A. E.: *Nat. Protoc.* 11, 1757 (2016).
- Baillache D. J., Valero T., Lorente-Macías Á., Bennett D. J., Elliott R. J. R., Carragher N. O., Unciti-Broceta A.: *RSC Med. Chem.* 14, 2611 (2023).
- Jiang X. a 10 spoluautorů: *J. Fluoresc.* (2023). doi: 10.1007/s10895-023-03344-7.
- Hermanson G. T., v knize: *Bioconjugate Techniques* (Hermanson G. T., ed.), 3. vyd., str. 395. Academic Press, Boston 2013.
- Gao P., Pan W., Li N., Tang B.: *Chem. Sci.* 10, 6035 (2019).
- Abdelfatah S., Berg A., Böckers M., Efferth T.: *J. Adv. Res.* 16, 145 (2019).
- Abu-Elheiga L., Brinkley W. R., Zhong L., Chirala S. S., Woldegiorgis G., Wakil S. J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 1444 (2000).
- Sando S., Narita A., Aoyama Y.: *ChemBioChem* 8, 1795 (2007).
- Lin K. K., Goodell M. A., v knize: *Methods in Cell Biology* (Darzynkiewicz Z., Holden E., Orfao A., Telford W., Wlodkowic D., ed.), 103. díl, str. 21. Academic Press, Amsterdam 2011.
- Pickup J. C., Hussain F., Evans N. D., Rolinski O. J., Birch D. J. S.: *Biosens. Bioelectron.* 20, 2555 (2005).
- Hardman K. D., Ainsworth C. F.: *Biochemistry* 11, 4910 (1972).
- Gnerucci A., Faraoni P., Romano G., Fusi F.: *Acta Histochem.* 121, 248 (2019).
- Leipold M. D., Ornatsky O., Baranov V., Whitfield C., Nitz M.: *Anal. Biochem.* 419, 1 (2011).
- Gil J., Passalacqua G., Deloche A., Vidal F. X., Dugas V., Demesmay C.: *Separations* 10, 437 (2023).
- Ullal A. J., Pisetsky D. S., Reich C. F.: *Cytometry, Part A* 77, 294 (2010).
- Knowles R. B., Sabry J. H., Martone M. E., Deerinck T. J., Ellisman M. H., Bassell G. J., Kosik K. S.: *J. Neurosci.* 16, 7812 (1996).
- Poot M., Gibson L. L., Singer V. L.: *Cytometry* 27, 358 (1997).
- Steinmetz M. O., Stoffler D., Hoenger A., Bremer A., Aebi U.: *J. Struct. Biol.* 119, 295 (1997).
- Gilloteaux J., Jamison J. M., Arnold D., Neal D. R., Summers J. L.: *Anat. Rec.* 288A, 58 (2006).
- Barak L. S., Yocum R. R., Webb W. W.: *J. Cell Biol.* 89, 368 (1981).
- Miller Y. I., Chang M.-K., Funk C. D., Feramisco J. R., Witztum J. L.: *J. Biol. Chem.* 276, 19431 (2001).
- Balciunaite-Murziene G., Dzikas M.: *Appl. Sci.* 11, 884 (2021).
- Kataoka H., Ushiyama A., Kawakami H., Akimoto Y., Matsubara S., Iijima T.: *Microsc. Res. Tech.* 79, 31 (2016).
- Stern A. D., Rahman A. H., Birtwistle M. R.: *Cytometry, Part A* 91A, 14 (2017).
- Cartellieri S., Hamer O., Helmholtz H., Niemeyer B.: *Biotechnol. Appl. Biochem.* 35, 83 (2002).
- Mellado M. C. M., Curbelo D., Nobrega R., Castilho L. R.: *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 82, 636 (2007).
- Ning P., Wang W. J., Chen M., Feng Y., Meng X. M.: *Chin. Chem. Lett.* 28, 1943 (2017).
- Sim P. F., Wan Mohamad Noor W. N. I., Inaba T., Suetsugu S., v knize: *Plasma Membrane Shaping* (Suetsugu S., ed.), str. 7. Academic Press, Cambridge 2023.
- Buckman J. F., Hernández H., Kress G. J., Votyakova T. V., Pal S., Reynolds I. J.: *J. Neurosci. Methods* 104, 165 (2001).
- Gao B. B., Gao L., Wang F.: *J. Innovative Opt. Health Sci.* 16, (2023).
- Ropraz P., Imhof B. A., Matthes T., Wehrle-Haller B., Sidibé A.: *J. Visualized Exp.* e58509 (2018).
- Dunn M. a 13 spoluautorů: *ACS Chem. Neurosci.* 9, 673 (2018).
- Hardebeck S., Schreiber S., Adick A., Langer K., Jose J.: *Int. J. Mol. Sci.* 24, 11858 (2023).
- Kowada T., Maeda H., Kikuchi K.: *Chem. Soc. Rev.* 44, 4953 (2015).
- Loudet A., Burgess K.: *Chem. Rev.* 107, 4891 (2007).
- Treibs A., Kreuzer F. H.: *Liebigs Ann. Chem.* 718, 208 (1968).
- Kossatz S. a 22 spoluautorů: *Nat. Biomed. Eng.* 4, 272 (2020).

47. Irwin C. P., Portorreal Y., Brand C., Zhang Y., Desai P., Salinas B., Weber W. A., Reiner T.: *Neoplasia* 16, 432 (2014).
48. Shi Z., Han X., Hu W., Bai H., Peng B., Ji L., Fan Q., Li L., Huang W.: *Chem. Soc. Rev.* 49, 7533 (2020).
49. Qi S., Kwon N., Yim Y., Nguyen V.-N., Yoon J.: *Chem. Sci.* 11, 6479 (2020).
50. Dai M., Yang Y. J., Sarkar S., Ahn K. H.: *Chem. Soc. Rev.* 52, 6344 (2023).
51. Adhikari S., Moscatelli J., Smith E. M., Banerjee C., Puchner E. M.: *Nat. Commun.* 10, 3400 (2019).
52. Zhang Y., Zheng Y., Tomassini A., Singh A. K., Raymo F. M.: *Molecules* 28, 2447 (2023).
53. Kobayashi T., Komatsu T., Kamiya M., Campos C., González-Gaitán M., Terai T., Hanaoka K., Nagano T., Urano Y.: *J. Am. Chem. Soc.* 134, 11153 (2012).
54. Loredó A., Tang J., Wang L., Wu K. L., Peng Z., Xiao H.: *Chem. Sci.* 11, 4410 (2020).
55. Wijesooriya C. S., Peterson J. A., Shrestha P., Gehrmann E. J., Winter A. H., Smith E. A.: *Angew. Chem., Int. Ed.* 57, 12685 (2018).
56. Collot M., Pfister S., Klymchenko A. S.: *Curr. Opin. Chem. Biol.* 69, 102161 (2022).
57. Ashokkumar P., Ashoka A. H., Collot M., Das A., Klymchenko A. S.: *Chem. Commun.* 55, 6902 (2019).
58. Yao H. W., Zhu X. Y., Guo X. F., Wang H.: *Anal. Chem.* 88, 9014 (2016).
59. Razansky D., Deliolanis N. C., Vinegoni C., Ntziachristos V.: *Curr. Pharm. Biotechnol.* 13, 504 (2012).

J. Stanková, M. Hajdúch, and P. Džubák (*Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University, Olomouc, Czech Republic*): **Identification of Cellular Targets of Active Substances Using Microscopic Methods and Fluorescent Probes**

Target identification of active substances is critical in optimizing drugs and minimizing side effects. The complex nature of biological systems presents challenges; to meet them, however, microscopic methods, particularly phenotypic screening, represented by "Cell Painting" method and fluorescent probes, can be used as valuable tools for understanding the impact of various substances at the cellular and organelle levels. These methods enable rapid testing of large libraries of compounds and offer unique insights into their mechanism of action by observing cell behavior, assessing cell morphology, motility, division, and migration. However, live cell microscopy faces challenges like phototoxicity, requiring a careful selection of fluorescent labels and optimized conditions. Among synthetic probes for live cell microscopy, BODIPY dyes stand out for their synthetic versatility and photophysical properties, providing minimal sample damage during bioimaging.

Keywords: drug target, mechanism of action, microscopy, fluorophores, BODIPY

Acknowledgements

This research was supported by an infrastructure grant Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (EATRISCZ – LM2023053 and CZ-OPENSREEN LM2023052), by the EXCELES program, project ID No. LX22NPO5102, state support of the Technology Agency of the Czech Republic within the program of the National Center of Competence (TN02000109) and an internal grant from the Palacký University in Olomouc (IGA_LF_2023_025).



Užití tohoto díla se řídí mezinárodní licencí Creative Commons Attribution License 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.cs>), která umožňuje neomezené využití, distribuci a kopírování díla pomocí jakéhokoliv média, za podmínky řádného uvedení názvu díla, autorů, zdroje a licence.

TESTOVÁNÍ VLIVU POTRAVINÁŘSKÝCH LÁTEK NA IZOLACI DNA Z MAKRELY OBECNÉ A RYBÍCH PRODUKTŮ

ELIŠKA ČERMÁKOVÁ^{a,b}, KATEŘINA KODEŠOVÁ^b, PETRA HORKÁ^c, KATEŘINA DEMNEROVÁ^b
a KAMILA ZDEŇKOVÁ^b

^a Výzkumný ústav potravinářský Praha, v. v. i, Radiová 1285/7, 102 00 Praha 10 – Hostivař, ^b Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6 – Dejvice, ^c Ústav pro životní prostředí, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Benátská 2, 128 01 Praha 2, Česká republika
Kamila.Zdenkova@vscht.cz

Došlo 30.11.23, přijato 15.2.24.

Autentizace rybích výrobků s využitím analýzy DNA vyžaduje získání kvalitní DNA bez přítomnosti inhibitorů. V současné době jsou dostupné různé metody pro izolaci nukleových kyselin; pro svou rychlost a nenáročnost extrakčního postupu se staly velmi oblíbenými zejména silikátové centrifugační kolonky. Jejich nevýhodou však může být princip využívající záporný náboj DNA, který může být ovlivněn složením potravin, nebo jejich ucpání v důsledku špatné předúpravy vzorků. Cílem této práce bylo porovnat tři metody izolace DNA využívající různé principy (silikátové centrifugační kolonky, modifikované magnetické kuličky, cetyltrimethylamonium-bromid (CTAB) a chloroformová extrakce) a zhodnotit jejich vhodnost pro izolaci DNA z rybí svaloviny. Posuzovanými kritérii byla výtěžnost, čistota a amplifikovatelnost izolované DNA. Analyzována byla tkáň makrely obecné bez a s přidavkem přídatných látek běžně používaných při výrobě rybích produktů, konkrétně difosforečnanů (E 450) a barviv (E 110 a E 124), a následně byla vybraná metoda aplikována i na komerčně nabízené výrobky z ryb. Jako nejvhodnější se ukázala upravená metoda využívající detergent CTAB.

Klíčová slova: amplifikace, autentizace potravin, DNA analýza, inhibice, izolace DNA, PCR, rybí produkty

Obsah

1. Úvod
2. Experimentální část
 - 2.1. Vzorky
 - 2.2. Izolace nukleových kyselin
 - 2.2.1. Izolace kitem DNeasy[®] mericon Food Kit
 - 2.2.2. Izolátor croBEE[®] NA16 Nucleic Acid Extraction System Plus
 - 2.2.3. Izolace s využitím detergentu CTAB
 - 2.3. Ověření kvality a kvantity izolované DNA
 - 2.4. Ověření amplifikovatelnosti DNA s využitím PCR v reálném čase s fluorescenční detekcí
3. Výsledky a diskuse
 - 3.1. Izolace DNA z rybí svaloviny a sledování vlivu vybraných potravinářských látek na množství a kvalitu izolované DNA
 - 3.2. Izolace DNA z rybích výrobků
 - 3.3. Ověření kvality DNA s využitím qPCR v reálném čase s fluorescenční detekcí
4. Závěr

1. Úvod

Mořské ryby se stále častěji objevují na jídelníčku obyvatel střední Evropy. V České republice jsou vedle čerstvých ryb nejčastěji prodávány ryby uzené nebo zpracované do výrobků, jako jsou rybí konzervy či pomazánky. Autentizace takových potravin je složitá, protože nelze určit použitý druh na základě morfologických znaků. Pro nepoctivé výrobce to znamená, že mohou snadno nahradit deklarovaný rybí druh méně kvalitním a/nebo levnějším. To vede k falšování potravin záměnou rybích druhů nebo uvedením nadhodnoceného obsahu rybí svaloviny na etiketě, než je ve skutečnosti při výrobě použito^{1,2}. Riziko falšování se v posledních letech značně zvyšuje nejen vlivem rostoucí celosvětové spotřeby ryb a zvyšujícími se náklady na výrobu daných produktů, ale také poklesem populací volně žijících ryb ve světových oceánech a mořích²⁻⁴. Z výše uvedených důvodů je klíčové disponovat vysoce specifickými a rychlými metodami umožňujícími ověření autenticity ryb a rybích výrobků. Jednou z efektivních metod pro stanovení množství a identifikaci druhů ryb ve výrobku je polymerasová řetězová reakce (PCR, angl. Polymerase Chain Reaction). Další vhodnou metodou je například metoda izotermické amplifikace zpro-

středkované smyčkou (LAMP, angl. Loop-mediated isothermal amplification), která se pro rozlišení druhů ryb využívá teprve pár let⁵. V obou případech je však nezbytné získat izolát nukleové kyseliny (NK) z analyzovaného vzorku, který slouží jako matrice pro analýzu.

Pro správnou detekci druhů ve vzorku je důležité zajistit kvalitní a čistý izolát NK, jelikož na něm závisí účinnost používaných metod. Extrakce NK ze vzorků zahrnuje lyzi buněčných membrán, inaktivaci buněčných nukleas a separaci NK od zbytků buněk. Kvalita DNA je určována délkou fragmentů NK a stupněm jejího poškození, které může být způsobeno různými faktory, například chemickými (látkami využívanými při výrobě potravin), fyzikálními (vyšší teploty, nízké pH, mechanické poškození) a/nebo enzymovými (nukleasy). K degradaci DNA v průběhu zpracování potravinářské suroviny typicky přispívá dlouhotrvající tepelná úprava při konzervaci výrobku či chemická modifikace a hydrolýza DNA v kyselém prostředí, např. u výrobků konzervovaných v octovém nálevu nebo v rajčatovém protlaku. U takto upravených produktů může dojít k ovlivnění výsledků analýz NK. Příčinou nepřesné detekce může být i nízká čistota izolátu NK vlivem nedostatečného odstranění doprovodných látek, které mohou působit jako inhibitory reakce. Pečlivý výběr vhodné izolační metody a procesu purifikace NK je tak při analýze rybích produktů zcela zásadní.

Přítomnost inhibitorů reakce v testovaném materiálu redukuje účinnost amplifikačních metod, například PCR. Mezi inhibitory PCR řadíme běžné složky potravin, jako jsou kationty (Ca^{2+} , Fe^{3+}), těžké kovy, uhlovodíky, tanin (kyselina tříslová), fenoly a soli (NaCl , dusitany). Dále pak proteasy degradující DNA-polymerasy a činidla denaturující DNA-polymerasy, jako je dodecylsírán sodný (SDS), fenol, močovina, Triton X-100 a cetyltrimethylamonium-bromid (CTAB), která bývají používána i při izolaci DNA. Inhibovat reakci mohou rovněž polysacharidy vázající se na aktivní doménu DNA-polymerasy a faktory interferující s ionty hořčičku, mezi které řadíme nukleosidtrifosfáty, primery, chelatační látky (kyselina ethylendiamintetraoctová – EDTA, kyselina egtazová – EGTA), DNA, ionty kovů a proteiny. Účinnost amplifikace tak může být snížena i vysokou koncentrací primerů či DNA v reakční směsi, která vede rovněž ke snížení specifity konkrétní reakce^{6–9}.

Potenciálními inhibitory mohou být i další potravinářské přídatné látky běžně používané za účelem prodloužení doby trvanlivosti či vylepšení chuti potravin. K povoleným látkám využívaným pro úpravu nezpracovaných ryb patří zejména antioxidanty, stabilizátory, konzervanty, tavicí soli, fosforečnany a regulátory kyselosti. Pro zpracované výrobky z ryb jsou používány látky ze skupin barviv, konzervantů, siričitanů, dusičnanů, fosforečnany a stabilizátory. Například Žluť SY (Sunset Yellow FCF, Gelborange S; E 110) a Ponceau 4R (košenilová červená A; E 124) jsou syntetická barviva, která dodávají náhražkám lososa požadovaný stabilní odstín a činí je vizuálně přitažlivějšími. Často je tak E 110 a E 124 používáno v rybích pomazánkách nebo u rybích filetů á la losos a jim podobných

výrobci^{10,11}. Do skupin konzervantů (E 338, E 450–452), tavicích solí (E 339, E 450, E 452), stabilizátorů (E 340–343), modifikovaných škrobů a zahušťovačů (E 451) nebo zvlhčujících látek (E 452) mohou být zařazeny kyselina fosforečná (E 338), fosforečnany (E 339–343), di- (E 450), tri- (E 451) a polyfosforečnany (E 452). Na českém trhu jsou dostupné pouze rybí výrobky s přídavkem E 450–452 (cit.¹¹), které jsou používány jako konzervační solící látky. Hlavním důvodem přidávání fosforečnanů je zlepšení vzhledu produktů. Pozitivní účinky fosforečnanů na barvu a obchodní kvalitu solených ryb jsou způsobeny snížením oxidace lipidů a bílkovin ve svalovině, která jinak vede k tmavší barvě výrobků.

Zmíněné přídatné látky je nutné během izolace DNA odstranit. Pro výběr konkrétní izolační metody je tak určující povaha vzorku, doba izolace, cena materiálu a možnost automatizace. K izolaci DNA se dnes nejčastěji využívá extrakce na pevné fázi, konkrétně na silikátových kolonkách nebo magnetických částicích, a to z důvodu časových úspor a jednoduchosti provedení v porovnání s organickou extrakcí.

Cílem této studie je navržení vhodné metodiky pro izolaci DNA z ryb a rybích výrobků. Za tímto účelem byla ověřena efektivita vybraných postupů izolace DNA na vzorcích rybí svaloviny, které byly ošetřeny přídavkem potravinářských přídatných látek, a vybraných komerčních výrobcích. Pro přípravu modelových vzorků (rybí svalovina s přídavkem vybraných látek) byla využita svalovina makrely obecné (*Scomber scombrus*, Linnaeus 1766), která je díky svým nutričním a chuťovým vlastnostem^{12–14}, ale i snadnému rybolovu jednou z nejvíce konzumovaných ryb ve světě^{4,15}. Dílčím krokem hodnocení kvality izolované DNA bylo ověření její amplifikovatelnosti s využitím PCR. Jako marker byl využit jaderný gen pro významný rybí alergen – parvalbumin. Díky tomu může metodika přispět i k významné ochraně zdraví spotřebitele.

2. Experimentální část

Analýza DNA pocházející z potravin zahrnovala odběr a přípravu vzorku pro izolaci DNA. DNA byla izolována třemi různými způsoby a poté byla vyhodnocena kvalita a kvantita izolátů DNA. Ověřena byla i možnost amplifikace DNA pomocí vybrané molekulárně-biologické metody (obr. 1).

2.1. Vzorky

V této studii byly analyzovány vzorky svaloviny makrely obecné (*Scomber scombrus*) s přídavkem a bez přídavku vybraných přídatných látek tak, aby modelovaly složení komerčních výrobků. Pro skupinu vzorků s přídavkem přídatných látek bylo k 200 mg homogenizované svaloviny makrely obecné před samotnou izolací přidáno 8 μl 5% roztoku směsi potravinářských barviv (kombinace E 110 a E 124, ADITIVA CZ s.r.o., ČR) nebo 10 μl 10% roztoku difosforečnanů (E 450, Raps GmbH & Co. KG,



Obr. 1. Pracovní postup při výběru vhodné metody izolace DNA

Německo), což odpovídá údajům o daných přídatných látkách uvedeným výrobcem na etiketě (množství 2000 mg kg⁻¹, resp. 5000 mg kg⁻¹). Vzorky byly homogenizovány mlýnkem IKA A10 (IKA-Werke, Staufen im Breisgau, Německo) a následně rozváženy po 200 mg do mikrozku mávek. Takto připravené byly uchovávány při -20 °C do doby dalšího zpracování.

Pro ověření účinnosti vybrané izolační metody i specifity navržených primerů pro identifikaci DNA makrelly pomocí PCR (viz tab. I) byly testovány následující vzorky ryb: kapr obecný (*Cyprinus carpio*), karas obecný (*Carassius carassius*), lín obecný (*Tinca tinca*), losos obecný (*Salmo salar*), pangas spodnooký (*Pangasianodon hypophthalmus*), pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*), pražma královská (*Sparus aurata*), sled' obecný (*Clupea harengus*), štika obecná (*Esox lucius*), tilapie nilská (*Oreochromis niloticus*), tolstolobik bílý (*Hypophthalmichthys molitrix*), tuňák obecný (*Thunnus thynnus*); z třídy ptáků: kur domácí (*Gallus gallus*), krocan divoký (*Meleagris gallopavo*), kachna domácí (*Anas platyrhynchos*); ze třídy savců: prase domácí (*Sus scrofa*), tur domácí (*Bos taurus*), kůň domácí (*Equus caballus*) a z rostlin: kukuřice setá (*Zea mays*).

Vhodnost vybrané izolační metody v praxi byla dále ověřena analýzou 16 komerčně prodávaných rybích výrobků (viz kapitola 3.2). Vzorky byly homogenizovány mlýnkem IKA A10 (IKA-Werke, Německo) a rozváženy do mikrozku mávek po 200 mg. Takto připravené byly uchovávány při -20 °C do dalšího zpracování.

2.2. Izolace nukleových kyselin

DNA z homogenizovaného vzorku svaloviny makrelly obecné bez přídavku potravinářských látek, s přídavkem barviv a s přídavkem difosforečnanů byla izolována každou z následujících metod (kap. 2.2.1–2.2.3). Vybranou metodou pak byla izolována také DNA ze vzorků tkání živočichů, kukuřice a komerčně nabízených rybích výrobků.

2.2.1. Izolace kitem DNeasy[®] mericon Food Kit

Izolace kitem DNeasy[®] mericon Food Kit (Qiagen, Německo) byla provedena z 200 mg homogenizovaného vzorku podle standardního protokolu s elucí do 100 µl elučního pufru.

2.2.2. Izolátor croBEE[®] NA16 Nucleic Acid Extraction System Plus

K naváženému homogenizovanému vzorku (200 mg) bylo přidáno 400 µl CTAB extrakčního pufru (20 g l⁻¹ CTAB; 1,4 mol l⁻¹ NaCl; 0,1 mol l⁻¹ Tris; 20 mmol l⁻¹ Na₂EDTA; pH 8,0). Směs byla důkladně promíchána a poté byla inkubována 20 minut při 95 °C za stálého míchání. Následovala centrifugace při 11 337 x g (13 000 rpm). 270 µl supernatantu bylo přeneseno do nové mikrozku mávky a bylo přidáno 20 µl proteinasy K, 10 µl RNA carrier a 100 µl TBE (Tris-borát-EDTA) pufru pro dosažení potřebného objemu (400 µl) stanoveného výrobem. Takto připravené vzorky byly vloženy do automatického izolátoru croBEE[®] NA16 Nucleic Acid Extraction System (GeneProof[®] a.s., ČR) s kazetami 201

Tabulka I
Přehled použitých primerů

Název	Sekvence (směr 5'–3')	Délka produktu	Amplifikovaná sekvence	Reference
M-F	CAGGACAAGAGTGGCTTCAT	215 bp*	Exon 2–Intron 2	Tato práce
M-R	GCTGTATAGGTGATAGGACAGA	193 bp**	β-parvalbuminu makrel	
R-F	GACAAGAGCGGCTTCATTGAGG	400 až	Exon 3-Exon 4	Rehbein H. ²⁸
R-R	TCAACTCCAATCTTGCCATCACCAT	600 bp	β-parvalbuminu ryb	

* makrela obecná (GenBank: FN544077.1), ** makrela japonská (GenBank: EF016113.1)

se všemi potřebnými roztoky pro izolaci. Eluce DNA byla provedena do sterilní mikrozkuhavky, eluční objem byl 100 μl .

2.2.3. Izolace s využitím detergentu CTAB

Extrakce byla provedena podle EN ISO 21571:2005 (cit.¹⁶) s následujícími úpravami: k připraveným vzorkům svalovin bylo naváženo 50 mg skleněných kuliček o průměru 0,6–0,8 mm a 650 μl CTAB extrakčního pufru, vzorek byl homogenizován pomocí přístroje FastPrep (MP Biomedicals, CA), resuspendace pelety nukleových kyselin byla provedena v 50 μl vody zbavené nukleas (NFW).

Izoláty DNA byly uchovávány v lednici při teplotě 2 až 8 $^{\circ}\text{C}$, v případě delšího skladování pak v mrazicím boxu při teplotě -20°C .

2.3. Ověření kvality a kvantity izolované DNA

Kontrola integrity a čistoty DNA izolované ze vzorku byla provedena pomocí horizontální agarosové elektroforézy s vizualizací zobrazovacím systémem Quantum (Vilber Lourmat, Francie) po barvení Midori Green Advance (NIPPON Genetics, Německo). Kvalita a kvantita DNA byly stanoveny spektrofotometricky pomocí NanoDropTM One (ThermoFisher Scientific, USA), fluorimetricky pomocí QuantusTM Fluorimetr (Promega, USA) a s využitím PCR v reálném čase s fluorescenční detekcí (kapitola 2.4). Rozdíly mezi hodnotami koncentrace a čistoty DNA byly hodnoceny pomocí t-testu za využití Excel 2016 (Microsoft Office).

Izolovaná DNA byla zředěna na zásobní koncentraci 25 $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$ v NFW, dále pak ředěna dle potřeby v NFW.

2.4. Ověření amplifikovatelnosti DNA s využitím PCR v reálném čase s fluorescenční detekcí

Amplifikace DNA s využitím metody PCR byla provedena v reakční směsi HOT FIREPol[®] EvaGreen[®] qPCR Supermix (Solis BioDyne, Estonsko). Složení reakční směsi bylo dle doporučení výrobce; koncentrace primerů

byla 0,2 $\mu\text{mol l}^{-1}$. Pro PCR byly použity dvě sady primerů (viz tab. I): univerzální pro rybí DNA (primery “R”) a specificky navržené pro DNA makrely obecné (primery “M”). Teplotní cyklus pro qPCR zahrnoval počáteční aktivaci polymerasy a denuraci DNA při 95 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 12 min, následovanou 45 cykly při 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s a 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s. Analýza křivek tání byla provedena v rozsahu 60–95 $^{\circ}\text{C}$. Výsledky byly vyhodnoceny analýzou křivek tání i prostřednictvím horizontální agarosové elektroforézy v 2 % gelu. Analýzy byly prováděny na dvou pracovištích, v laboratoři VÚPP v.v.i. (termocykler StepOne Plus, Applied Biosystems) a Zkušební laboratoři ÚBM VŠCHT Praha (ABI 7500, Applied Biosystems).

Efektivita amplifikace v PCR byla použita jako parametr pro stanovení míry inhibice v přítomnosti nežádoucích látek ze vzorku. K hodnocení byl využit dokument pro ověřování analytických metod pro testování geneticky modifikovaných organismů při zavádění mezilaboratorně validovaných metod¹⁷. Sledovanými parametry byly: sklon regresní přímky, požadováno rozmezí mezi $-3,6$ a $-3,1$; efektivita 90–110 % a koeficient determinace $R^2 \geq 0,98$. Parametry kalibračních přímků byly zjištěny přímo v softwaru v2.3 pro přístroj ABI 7500 Real Time PCR System a Design & Analysis 2.6.0.

3. Výsledky a diskuse

Cílem této práce byl výběr nejvhodnější metody pro izolaci DNA z ryb a rybích výrobků. Testovány byly tři metody, založené na odlišných principech, konkrétně využití (a) silikátových centrifugačních kolonek (DNeasy[®] mericon Food Kit), (b) modifikovaných magnetických kuliček (izolátor croBEE[®] NA16) a (c) izolace s využitím CTAB (tab. II).

DNA byla izolována ze svaloviny makrely obecné bez a s přidávkou přídatných látek běžně používaných při výrobě rybích produktů, konkrétně difosforečnanů (E 450) a barviv (E 110 a E 124), a následně byla vybraná izolační metoda ověřena na komerčních rybích výrobcích. Výběr

Tabulka II
Princip použitých metod izolace DNA^{16,29–32}

Metoda	Princip
Silikátové kolonky (DNeasy [®] mericon Food Kit)	– selektivní sorpce DNA na silikátové částice v prostředí chaotropních solí, – extrakce na pevné fázi, – separace od proteinů, polysacharidů a dalších buněčných zbytků: na kolonku se nevážou a jsou během izolace odstraněny
Magnetické částice (croBEE [®] NA16)	– vazba DNA k povrchově modifikovaným magnetickým částicím, – extrakce na pevné fázi, – separace od proteinů, polysacharidů a buněčných zbytků: využitím magnetické síly
Metoda využívající CTAB	– kationtový surfaktant zajišťující buněčnou lyzi, – komplex CTAB-DNA rozpustný při vysoké koncentraci solí, – organická extrakce (chloroform), – separace od proteinů, lipidů, polysacharidů: extrakcí do chloroformu a následnou centrifugací

nejvhodnější metody izolace DNA z ryb byl proveden s ohledem na výtěžnost, čistotu, amplifikovatelnost DNA a efektivitu qPCR. Zohledněna byla také cena reakce a pracnost provedení.

3.1. Izolace DNA z rybí svaloviny a sledování vlivu vybraných potravinářských přídatných látek na množství a kvalitu izolované DNA

DNA ze vzorků rybí tkáně byla úspěšně izolována všemi výše uvedenými metodami. Následně byl testován vliv přidavku potravinářských látek na výslednou koncentraci a čistotu DNA. Ze spektrofotometricky stanovených koncentrací vyplývá, že přidavek barviv a fosforečnanů má jen malý vliv na výtěžek izolace (tab. III). Koncentrace naměřené u vzorků s přidavkem potravinářských látek a bez těchto látek se, podle výsledků t-testu, významně lišily (hladina významnosti $\alpha = 0,05$) pouze u izolátu DNA ze vzorku makrely s přidavkem potravinářského barviva v případě izolace pomocí CTAB a přístroje croBEE[®] a makrely s přidavkem fosfátů při použití přístroje croBEE[®]. Poměr absorbancí A při 260 nm ku A při 280 nm se v případě metody využívající CTAB i komerčního kitu DNeasy[®] mericon Food Kit pohyboval u všech testovaných vzorků v rozmezí 1,83–1,87, což odpovídá požadované čistotě izolátu DNA; při použití croBEE[®] byl daný poměr v rozmezí 1,96–2,04. Izolátor croBEE[®] je určený pro rychlou simultánní izolaci nukleových kyselin (DNA i RNA), dosažený poměr absorbancí tak odpovídá i přítomnosti RNA izolované ze vzorku. Napříč metodami ani vzorky nebyl pozorován jednotný trend nárůstu či poklesu koncentrace a /nebo změny čistoty DNA v důsledku přidavku potravinářských látek (tab. III).

Nejlepší výsledky byly dosaženy metodou využívající CTAB, která poskytla nejvyšší výtěžnost (v průměru 1,7krát vyšší koncentrace DNA než ostatní metody) i požadovanou čistotu DNA; izolovaná DNA byla též amplifi-

kovatelná (kapitola 3.3). Naopak automatická izolace přístrojem croBEE[®] poskytovala izoláty s nižší koncentrací DNA a významným zastoupením RNA.

Metody využívající CTAB byly popsány jako vhodný nástroj pro izolaci DNA z rybí svaloviny i v jiných publikacích. Například Masri a spol.¹⁸, kteří porovnávali různé metody izolace DNA ze svaloviny lososa, izolovali metodou využívající CTAB v průměru 60 μg DNA ze 100 mg analyzovaného vzorku, zatímco testované komerční kity poskytly výtěžnost 20–50 μg DNA ze 100 mg vzorku. V práci Debode a spol.¹⁹ týkající se detekce transgenických lososovitých ryb bylo metodou využívající CTAB izolováno až 2,5krát více DNA než komerčním kitem DNeasy[®] mericon Food, což je v souladu s našimi výsledky. Uvedený komerční kit použili ve své práci například také Piskata a spol.²⁰ a Servusová a spol.²¹, kteří úspěšně izolovali DNA ze syrové i tepelně opracované svaloviny tuňáka žlutoploutvého (*Thunnus albacares*). Dosažené výsledky izolace DNA pro syrovou svalovinu byly řádově srovnatelné s našimi (51 $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$; $A_{260}/A_{280} = 1,8$). Pro tepelně zpracovanou svalovinu byly publikované výtěžky DNA s využitím kitu DNeasy[®] mericon Food znatelně nižší, a proto byla v naší předkládané studii pro navazující práci zvolena metoda využívající CTAB.

3.2. Izolace DNA z rybích výrobků

Dostatečné množství kvalitní DNA z homogenizované rybí svaloviny bylo v minulosti získáno pomocí různých protokolů^{22–25}. Z rybích výrobků je však izolace DNA v množství a kvalitě potřebné pro navazující DNA analýzy obtížnější. Kvalita i kvantita DNA v rybích výrobcích může být snížena výrobním procesem, zejména tepelným zpracováním, mixováním, ale také vlivem přídatných látek (např. konzervanty, barviva, emulgátory). Proto byl v této práci nejprve sledován vliv vybraných přídatných látek na samotnou izolaci DNA a vyhodnocena

Tabulka III

Porovnání vlivu přidavku potravinářských látek k rybí svalovině na množství a kvalitu izolované DNA. Koncentrace a absorbance DNA izolované ze svaloviny byly měřeny spektrofotometricky

Vzorek	Metoda	Koncentrace [$\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$] \pm SD ^a	A_{260}/A_{280}
Makrela	CTAB	149,4 \pm 0,9	1,88
	DNeasy [®] mericon Food Kit	74,0 \pm 5,6	1,85
	Automatický izolátor croBEE [®]	17,2 \pm 0,2	2,00
Makrela s přidavkem potravinářského barviva	CTAB	108,1 \pm 0,1	1,85
	DNeasy [®] mericon Food Kit	77,1 \pm 2,0	1,85
	Automatický izolátor croBEE [®]	15,8 \pm 0,3	2,04
Makrela s přidavkem fosforečnanů	CTAB	140,4 \pm 2,0	1,85
	DNeasy [®] mericon Food Kit	83,7 \pm 7,4	1,83
	Automatický izolátor croBEE [®]	24,4 \pm 0,1	1,96

^a SD – směrodatná odchylka

Tabulka IV

Ukázka výsledků izolace DNA z komerčních výrobků s použitím metody využívající CTAB

Název produktu	Koncentrace DNA [ng μl^{-1}]	A_{260}/A_{280}
Felix Soup	35,0 \pm 4,0	1,54 \pm 0,13
Losos s bylinkami	600 \pm 500	1,92 \pm 0,10
Losos uzený	1820 \pm 550	2,08 \pm 0,02
Losos ve vlastní šťávě	1121 \pm 72	1,98 \pm 0,01
Losos v tomatové omáčce	930 \pm 290	2,04 \pm 0,01
Lososová pomazánka a	140 \pm 120	2,03 \pm 0,15
Lososová pomazánka b	440 \pm 150	1,97 \pm 0,03
Makrela obecná uzená	80 \pm 40	1,70 \pm 0,10
Makrela ve slaném nálevu	126,7 \pm 9,5	1,71 \pm 0,08
Makrela v oleji	116 \pm 34	1,68 \pm 0,02
Grilované filety z makrely	390 \pm 370	1,74 \pm 0,24
Makrela v oleji a tomatové omáčce	730 \pm 62	1,99 \pm 0,01
Makrela ve vlastní šťávě	172 \pm 60	1,75 \pm 0,14
Pomazánka á la losos s kaviárem	4,1 \pm 2,6	1,81 \pm 0,17
Rizoto s mořskou treskou	39,5 \pm 7,0	2,77 \pm 0,22
Solená treska v oleji Varmuža	24,5 \pm 1,0	1,70 \pm 0,11

efektivita amplifikace pomocí PCR s ohledem na možný zůstatek inhibitorů v izolátu, a až poté byly analyzovány samotné komerční výrobky. Nebyl pozorován statisticky významný vliv testovaných přídatných látek, tyto přídatné látky v rybích výrobcích nebyly důvodem nižších výtěžků izolované DNA (tab. IV).

V tabulce IV jsou uvedeny výsledky úspěšné izolace z 15 komerčních výrobků; ze vzorku „Pomazánka á la losos s kaviárem“ bylo získáno pouze malé množství DNA, avšak čistota izolátu byla vysoká. Izolovanou DNA se tak podařilo amplifikovat s primery R u všech typů výrobků. Do reakce bylo přidáváno 50 ng DNA, díky čemuž mohlo dojít k dostatečnému naředění případných inhibitorů reakce v izolátu. Výjimkou byla jmenovaná pomazánka, u níž nebylo možné takto velké množství DNA do reakce přidat. V tomto případě tak bylo do reakční směsi přidáno pouze 5 μl neředěného izolátu DNA.

3.3. Ověření kvality DNA s využitím qPCR v reálném čase s fluorescenční detekcí

Amplifikace DNA proběhla úspěšně ve všech analyzovaných vzorcích ryb a rybích výrobků s využitím primerů R; primery M poskytly dle očekávání pozitivní výsledky pouze pro vzorky obsahující DNA makrely obecné. Při přidavku neředěné DNA do reakce poskytly nejnižší hodnoty prahových cyklů (Ct) izoláty získané kitem DNeasy[®] mericon Food, ačkoliv nejvyšší koncentraci a čistotu vykazovaly podle spektrofotometrických dat izoláty DNA získané metodou využívající CTAB. Stejný trend byl pozorován i při přidavku jednotného množství DNA do reakce, tedy po zředění izolátů a tak i možných inhibitorů

(tab. V). Z výše uvedeného lze usuzovat, že komerční kit by mohl být vhodnější v případě, kdy je potřeba odstranit více inhibitorů ze vzorku. Přítomnost možných inhibitorů v izolátu byla dále testována analýzou desetkrát zředěných vzorků, kdy bylo očekáváno, že při 100% účinnosti amplifikace bude ΔCt mezi dvěma ředěními rovno přibližně 3,3. V případě metody využívající CTAB bylo za použití primerů M pro amplifikaci ΔCt rovno 2,4 pro samotnou svalovinu, zatímco u komerčního kitu byl rozdíl roven 3,0. O něco lepších výsledků bylo dosaženo s primery R, kdy v případě metody využívající CTAB bylo ΔCt 2,9; pro komerční kit 3,1. Je tak patrné, že je při použití metody využívající CTAB potřeba dbát na pečlivé odstranění látek, které mohou mít vliv na průběh amplifikace.

U izolátů DNA získaných izolátorem croBEE[®] bylo možné pozorovat významně nižší hodnoty Ct (primery M) pro vzorky svaloviny s přidavkem fosforečnanů v porovnání s ostatními vzorky izolovanými touto metodou; u ostatních metod tento pokles zaznamenaný nebyl nebo byl zanedbatelný. Vzorky s přidavkem barviv poskytovaly o něco vyšší Ct u všech testovaných metod a při amplifikaci oběma sadami primerů.

Efektivita qPCR byla testována pomocí DNA izolované ze svaloviny makrely ředěné v NFW, ukázka amplifikačních křivek je uvedena na obr. 2, výsledky jsou shrnuté v tab. VI. Amplifikace proběhla ve všech vzorcích s přidanou DNA (100–0,098 ng v reakci). Všechny naměřené kalibrační přímky splňovaly požadovaná kritéria na směšnici (–3,6 až –3,1) a efektivitu (90–110 %). Vliv přídatných látek na efektivitu PCR tak nebyl prokázán (obr. 2). Požadavek na koeficient determinace R^2 ($\geq 0,98$) nebyl splněn pouze v případě DNA vzorku makrely

Tabulka V

Rozdíly hodnot prahových cyklů (Ct) v důsledku přidavku přídatných látek k svalovině makrelly obecné a/nebo vlivem izolační metody DNA

Metoda	Vzorek ^a	Množství ^b DNA v reakci [ng]	C _T ± SD	
			Primery M	Primery R
CTAB	M	100	25,74 ± 0,13	24,40 ± 0,11
	MB		26,35 ± 0,10	25,69 ± 0,49
	MF		25,75 ± 0,11	25,04 ± 0,05
DNeasy [®] mericon Food Kit	M	100	23,99 ± 0,05	23,08 ± 0,15
	MB		24,21 ± 0,12	23,30 ± 0,11
	MF		23,68 ± 0,14	23,00 ± 0,14
Automatický izolátor croBEE [®]	M	50	27,35 ± 0,13	netestováno
	MB		28,39 ± 0,21	
	MF		25,97 ± 0,17	

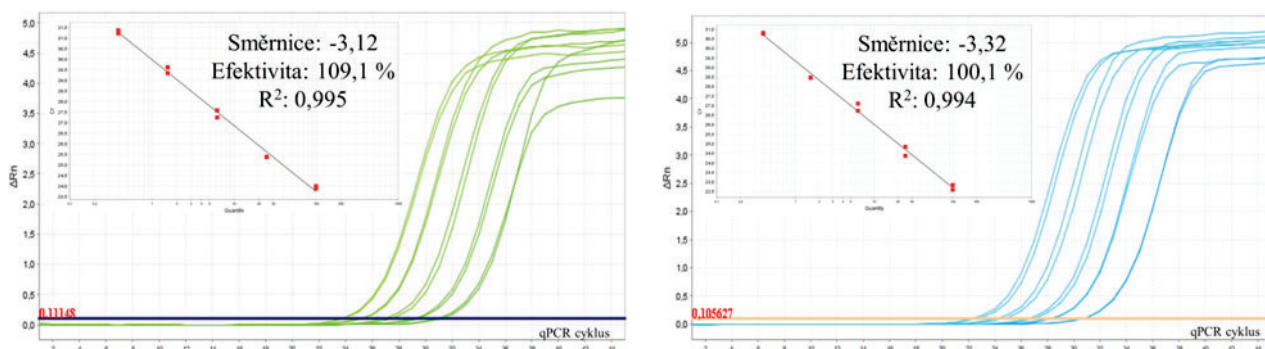
^a M – makrela obecná, MB – makrela obecná s přidavkem barviva, MF – makrela obecná s přidavkem fosforečnanů,

^b spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA

s přidavkem fosforečnanů izolované přístrojem croBEE[®], kde bylo dosaženo hodnoty 0,96. Dynamický rozsah pro kvantifikaci DNA byl při použití primerů R stanoven na 0,4–100 ng DNA v reakci v případě všech izolátů získaných metodou využívající CTAB a izolátů makrelly s přidavky přídatných látek izolovaných kitem DNeasy[®] mericon Food. Pro izoláty ze samotné makrelly byl dynamický rozsah v případě kytu 0,1–100 ng. V případě izolátoru croBEE[®] bylo dosaženo nižších výtěžků DNA, a proto byl testovaný rozsah nižší (tab. VI). Pro makrelu samotnou a s přidavky fosforečnanů byl dynamický rozsah stanoven na 0,4–25 ng, a pro makrelu s přidavkem barviv na 1,6–25 ng DNA v reakci. Při použití primerů pro makrelu bylo možné kvantifikovat DNA v nejvyšším dynamickém rozsahu při použití DNA izolované komerčním kitem DNeasy[®] mericon Food (0,1–100 ng pro čistou svalovinu;

0,4–100 při přidavku přídatných látek). Srovnatelný rozsah poskytla pouze DNA makrelly s přidavkem fosforečnanů izolovaná metodou využívající CTAB.

Metodu využívající CTAB ve své práci použili také Abdullah a Rehbein²⁶. Pro rozlišení výrobků z tuňáka (čeled' Scombridae) využili shodný úsek parvalbuminového genu jako v předkládané práci (primery R). Získané amplicony o délce cca 600 bp úspěšně sekvenovali, což dokazuje vhodnost metody využívající CTAB pro následné analýzy DNA. Izolace DNA metodou využívající CTAB s následnou amplifikací části parvalbuminového genu byla úspěšně použita také pro identifikaci DNA mořana tmavého (*Spondyliosoma cantharus*)²⁷. Laknerová a spol.²⁷ uvádějí, že kvalita i kvantita izolované DNA metodou využívající CTAB byla srovnatelná s DNA získanou komerčními kity na bázi silikátových centrifugačních kolonek.



Obr. 2. Příklad amplifikačních křivek a kalibračních přímek qPCR. Vlevo: qPCR s M primery, DNA izolovaná s využitím CTAB ze svaloviny makrelly obecné s přidavkem fosforečnanů, vpravo: qPCR s R primery, DNA izolovaná kitem DNeasy[®] mericon Food ze svaloviny makrelly obecné s přidavkem barviv

Tabulka VI
Porovnání sledovaných parametrů kalibračních křivek qPCR

Metoda	Vzorek ^a	qPCR s primery M				qPCR s primery R					
		Směrnice kalibrační přímky	Průsečík s osou Y	R ²	Efektivita [%]	Dynamický rozsah kvantifikace	Směrnice kalibrační přímky	Průsečík s osou Y	R ²	Efektivita [%]	Dynamický rozsah kvantifikace
CTAB	M	-3,49	31,2	0,971	93,4	1,6–100 ng	-3,27	33,5	0,999	102,2	0,4–100 ng
	MB	-3,33	30,9	1,000	99,6	1,6–25 ng	-3,25	34,2	0,997	103,1	0,4–100 ng
	MF	-3,12	30,0	0,995	109,1	0,4–100 ng	-3,57	32,6	0,991	90,5	0,4–100 ng
DNeasy [®] mericon Food Kit	M	-3,11	27,7	0,997	109,5	0,1–100 ng	-3,49	29,7	0,993	93,4	0,1–100 ng
	MB	-3,15	27,7	0,993	107,6	0,4–100 ng	-3,32	29,3	0,994	100,1	0,4–100 ng
	MF	-3,16	27,9	0,995	107,4	0,4–100 ng	-3,38	29,6	0,993	97,6	0,4–100 ng
Automatický izolátor croBEE [®]	M	-3,13	30,3	0,996	108,5	1,6–25 ng	-3,44	34,6	0,978	95,3	0,4–25 ng
	MB	-3,34	31,0	0,969	99,4	6,3–25 ng	-3,29	34,2	0,998	101,5	1,6–25 ng
	MF	-3,31	30,2	0,997	100,4	1,6–25 ng	-3,43	34,0	0,964	95,6	0,4–25 ng

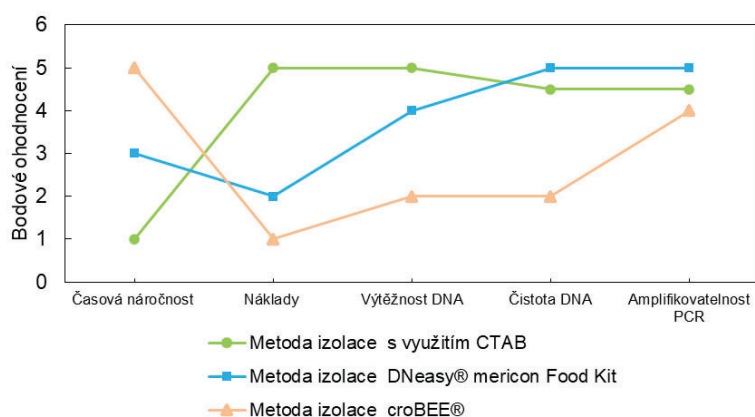
^a M – makrela obecná, MB – makrela obecná s přidavkem barviva, MF – makrela obecná s přidavkem fosforečnanů

Ve studii Piskata a spol.²⁰ byla testována amplifikovatelnost DNA z rybí svaloviny získané komerčním kitem DNeasy[®] mericon Food Kit a také kitem využívajícím magnetické částice Chemagic DNA Tissue 10 Kit. Primery v této práci byly navrženy na část mitochondriálního genu cytochrom-*c*-oxidasa I. DNA získaná oběma kity byla amplifikovatelná. V práci Servusová a spol.²¹, kde byly porovnávány dva komerční kity (DNeasy[®] mericon Food Kit a DNeasy[®] Blood & Tissue Kit) bylo prokázáno, že DNeasy[®] mericon Food Kit je vhodnější pro PCR analýzu ryb. Z výsledků experimentů bylo zřejmé, že amplifikace proběhla lépe ve vzorcích izolovaných tímto kitem, přestože koncentrace změřená spektrofotometricky byla nižší než u druhého kitu; DNeasy[®] mericon Food Kit tak byl označen jako lepší pro izolace DNA z konzervovaných rybích výrobků. Obdobný trend byl pozorován i v naší práci, kdy zmíněný kit poskytoval dle spektrofotometrických dat horší výtěžky než metoda využívající CTAB, ale při amplifikaci pomocí PCR se prokázala lepší kvalita DNA.

Nejvhodnější testovaná metoda izolace byla v této práci vyhodnocena na základě sledování několika parametrů – časové náročnosti, nákladů na 1 reakci, výtěžnosti a čistoty DNA stanovených spektrofotometricky a efektivitu PCR. Všechny testovanými metodami byla izolována DNA v dostatečném množství a kvalitě pro analýzu pomocí PCR s využitím primerů navrženými na oblast jaderného genu pro parvalbumin. Efektivita PCR byla pro všechny metody v optimálním rozmezí, a proto neměla na výběr metody vliv. Vyhodnocením stanovených parametrů se jako nejlepší metoda izolace DNA ze svaloviny makrely obecné (*Scomber scombrus*) ukázala metoda využívající CTAB. Téměř stejné výsledky byly získány také komerčním kitem DNeasy[®] mericon Food Kit, avšak pro jeho vyšší cenu a riziko ucpání kolonek při izolaci DNA z vybraných komerčních výrobků nebyl nakonec preferován. Nejméně vhodná metoda byla automatická izolace přístrojem croBEE[®] NA16 Nucleic Acid Extraction System Plus (obr. 3).

4. Závěr

Identifikace rybích druhů v potravinářských výrobcích je klíčová z hlediska prevence falšování i detekce alergenů. Kvalita izolované DNA však může ovlivnit výsledky analýz. V této studii byly porovnány tři přístupy izolace DNA ze svaloviny makrely obecné bez a s přidavkem potravinářských látek. Vybraná metodika pak byla použita pro izolaci DNA z komerčních rybích výrobků i dalších druhů živočichů. Nejlepší výtěžky DNA poskytla metoda využívající k lyzi i přečištění DNA kationtový detergent CTAB. Tato izolační metoda je cenově dostupná a jednoduchá, ale pro získání kvalitního čistého izolátu je třeba dbát na pečlivé odstranění organických rozpouštědel v jednotlivých fázích protokolu. Proto se zdá náročnější na provedení než komerční soupravy. Při srovnání výsledků izolace nebyl zaznamenán významný vliv



Obr. 3. Porovnání metod izolace DNA dle vybraných parametrů. Metody byly hodnoceny body v rozmezí 1–5 b., kde 5 b. značí nejlepší metodu. Výtěžnost a čistota DNA byly hodnoceny na základě výsledků spektrofotometrického měření. Jako čistá DNA byla považována taková, která měla poměr $A_{260}/A_{280} = 1,8$. Amplifikovatelnost DNA byla ohodnocena na základě dosaženého Ct a efektivity PCR

přidavku fosfátů nebo barviv na průběh izolace DNA; izoláty získané všemi testovanými metodami byly úspěšně amplifikovány pomocí qPCR. Komerční kit DNeasy® mericon Food by mohl být vhodnější v případě, kdy je potřeba odstranit více inhibitorů ze vzorku.

Práce byla finančně podpořena Ministerstvem zemědělství (grant číslo QK1910231) a Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy (projekt METROFOOD-CZ, č. LM2023064).

Použité zkratky

CTAB	cetyltrimethylamonium-bromid (<i>N,N,N</i> -trimethylhexadekan-1-aminium-bromid)
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EGTA	kyselina ethylenglykol-di-(2-aminoethylether)-tetraoctová
NFW	voda zbavená nukleas
NK	nukleové kyseliny
PCR	polymerasová řetězová reakce
qPCR	PCR v reálném čase s fluorescenční detekcí
SDS	dodecylsírán sodný

LITERATURA

- Sotelo C. G., Pérez-Martín R. I., v knize: *Fish and Seafood Authentication*, Vol. 952, kap. 8, str. 126. ACS Publications, 2007. doi: 10.1021/bk-2007-0952.ch008
- Čížková H., Ševčík R., Rajchl A., Pivoňka J., Voldřich M.: *Chem. Listy* 106, 903 (2012).
- OECD/FAO (2021): *OECD-FAO Agricultural Outlook 2021–2030*, FAO, Rome/OECD Publishing, Paris 2021.
- FAO: *The state of world fisheries and aquaculture (SOFIA)*. FAO, Rome 2020.
- Cermakova E., Lencova S., Mukherjee S., Horka P., Vobruba S., Demnerova K., Zdenkova K.: *Foods* 12, 228 (2023).
- Sovová T., Křížová B., Hodek J., Ovesná J.: *J. Sci. Food Agric.* 96, 997 (2016).
- Schrader C., Schielke A., Ellerbroek L., Johne R.: *J. Appl. Microbiol.* 113, 1014 (2012).
- Sidstedt M., Rådström P., Hedman J.: *Anal. Bioanal. Chem.* 412, 2009 (2020).
- Sovová T., Křížová B., Drábková L., Ovesná J.: *Czech J. Food Sci.* 35, 160 (2017).
- EUR-Lex. Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008 ze dne 16. prosince 2008 o potravinářských přídatných látkách. Úřední věstník Evropské unie 7 (2008).
- FÉR Potravina: <https://www.ferpotravina.cz/ecka>, staženo 29. 10. 2023.
- Froese R., Pauly D.: <https://www.fishbase.se/summary/118>, staženo 29. 10. 2023.
- Catanese G., Machado M., Infante C.: *Gene* 452, 35 (2010).
- Sun S., Wang S., Lin R., Cheng S., Yuan B., Wang Z., Tan M.: *Foods* 9, 364 (2020).
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. European Price Report – January 2023. <https://www.fao.org/3/cc3261en/cc3261en.pdf>, staženo 29. 10. 2023.
- EN ISO. 21571: 2005. *Foodstuffs: Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products-Nucleic acid extraction*, 43 (2013).
- Hougs L., Gatto F., Goerlich O., Grohmann L., Lieske K., Mazzara M., Narendja F., Ovesná J., Papazova N., Scholtens I.: *Testing and Analysis of GMO-containing Foods and Feed*. Publications Office of the European Union, Lucemburk 2017.
- Masri S., Rast H., Ripley T., James D., Green M., Jia X.,

- Devlin R. H.: *J. Agric. Food Chem.* 50, 3161 (2002).
19. Debode F., Janssen E., Marien A., Devlin R. H., Lieske K., Mankertz J., Berben G.: *Food Anal. Methods* 11, 2396 (2018).
 20. Piskata Z., Pospisilova E., Borilova G.: *Int. J. Food Prop.* 20, S430 (2017).
 21. Servusová E., Babak V., Piskata Z., Krčmář P.: *Acta Vet. Brno* 88, 315 (2019).
 22. Mukherjee S., Hanak P., Jilkova D., Musilova Z., Horka P., Lerch Z., Zdenkova K., Cermakova E.: *J. Food Compos. Anal.* 115, 104992 (2023).
 23. Chowdhury M. M., Rahman A., Nahar L., Rahman M., Al Reza H., Ahmed M. S.: *IOSR J. Pharm. Biol. Sci.* 11, 11 (2016).
 24. Taggart J., Hynes R., Prodöuhl P., Ferguson A.: *J. Fish Biol.* 40, 963 (1992).
 25. Akhatova D., Laknerova I., Zdenkova K., Ólafsdottir G., Magnúsdó S., Píknova E., Kyrova V., Lerch Z., Hanak P.: *J. Food Nutr. Res.* 57, 27 (2018).
 26. Abdullah A., Rehbein H.: *J. Sci. Food Agric.* 96, 456 (2016).
 27. Laknerová I., Zdeňková K., Purkrťová S., Píknová E., Vyroubalová Š., Hanák P.: *J. Food Qual.* 37, 429 (2014).
 28. Rehbein H.: *Dtsch. Lebensmitt. Rundsch.* 101, 333 (2005).
 29. Karp A., Isaac P. G., Ingram D. S., v knize: *Molecular Tools for Screening Biodiversity: Plants and Animals*, str. 59. Springer, Londýn 1998.
 30. Tan S. C., Yiap B. C.: *Biomed Res. Int.* 2009, 574398 (2009).
 31. Emaus M. N., Varona M., Eitzmann D. R., Hsieh S.-A., Zeger V. R., Anderson J. L.: *TrAC, Trends Anal. Chem.* 130, 115985 (2020).
 32. Brown R. B., Audet J.: *J. R. Soc. Interface* 5, S131 (2008).

E. Čermáková^{a,b}, K. Kodešová^b, P. Horká^c, K. Demnerová^b, and K. Zdeňková^b (^a*Food Research Institute Prague*, ^b*Department of Biochemistry and Microbiology, University of Chemistry and Technology, Prague*, ^c*Institute for Environmental Studies, Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech Republic*): **Testing of the Effect of Food Additives on the DNA Isolation from Mackerel and Fish Products**

Authentication of fish products by DNA analysis requires the extraction of high quality DNA without the presence of inhibitors. Many nucleic acid isolation methods are currently available; silicate centrifugal columns have become very popular due to their speed and ease of extraction. However, their disadvantage may be the principle based on DNA charge, which may be affected by food composition, or clogging due to a poor sample pretreatment. The aim of this work was to compare three DNA isolation methods using different principles (silicate centrifugal columns, modified magnetic beads, Cetrimonium bromide and chloroform extraction) and to evaluate their suitability for DNA isolation from fish muscle. The criteria assessed were the recovery, purity and amplifiability of the isolated DNA. Mackerel tissue was analysed without and with the addition of additives commonly used in the manufacture of fish products, namely diphosphates (E 450) and colorants (E 110 and E 124), and the selected method was subsequently applied to commercial fish products. The modified method using the detergent CTAB proved to be the most suitable.

Keywords: amplification, DNA analysis, DNA isolation, fish products, food authentication, inhibition, PCR

Acknowledgements

This work was supported by the grant No. QK1910231 from the Ministry of Agriculture and by METROFOOD-CZ project MEYS Grant No. LM2023064.



Užití tohoto díla se řídí mezinárodní licencí Creative Commons Attribution License 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.cs>), která umožňuje neomezené využití, distribuci a kopírování díla pomocí jakéhokoliv média, za podmínky řádného uvedení názvu díla, autorů, zdroje a licence.

INTEGRACE BRANNÉ VÝCHOVY DO VÝUKY (NEJEN) CHEMIE: RADIOAKTIVITA A JADERNÉ ZBRANĚ

PAVEL TEPLÝ^a, SVATAVA JANOUŠKOVÁ^a a PETR DISTLER^{a,b}

^a Katedra učitelství a didaktiky chemie, Přírodovědecká fakulta UK, Albertov 6, 128 00 Praha 2, ^b Katedra jaderné chemie, Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská ČVUT, Břehová 7, 115 19 Praha 1, Česká republika
svatava.janouskova@natur.cuni.cz

Došlo 8.11.23, přijato 18.1.24.

Ochrana člověka za mimořádných událostí je povinný vzdělávací obsah volně navazující na bývalou brannou výchovu, o jejímž obnovení se v kontextu událostí poslední doby opět diskutuje. Nabízí velmi širokou paletu témat, která lze zařadit nejen do výuky chemie, ale i jiných (nejen) přírodních věd. Velmi vhodné je např. zařazení do výuky jako (krátko či střednědobý) projekt zaměřený na téma radioaktivita a jaderné zbraně, které je pro žáky zajímavé. Pro realizaci projektu byla autory článku vytvořena pojmová mapa a návodné otázky, a také seznam doporučených zdrojů informací, které mohou učitelé a jejich žáci využít. Cílem projektu je nejen nabýt nové znalosti a vědomosti v souvislosti s tématem jaderných zbraní a radioaktivity, ale také získat ucelený přehled díky mezipředmětovému uspořádání.

Klíčová slova: branná výchova, radioaktivita a ionizující záření, jaderné zbraně, výuka chemie

1. Úvod

V kontextu dnešní doby můžeme najít velké množství kontroverzních témat a s tím souvisejících extrémních postojů. To se týká i jaderných zbraní. Abychom případným hrozbám porozuměli, je zapotřebí pochopit fyzikální, chemické a biologické koncepty týkající se principu jaderných zbraní, účinky ionizujícího záření a jeho (ne) bezpečnost. Teprve potom se aktivně lze účastnit celospolečenské debaty. Náš text se zaměřuje na možnosti zařazení tématu radioaktivity a jaderných zbraní do výuky (nejen) chemie. V textu přinášíme návod k tomu, jak zpracovat téma na úrovni středních škol a gymnázií. Chemie v našem pojetí tvoří zastřešující obor, přičemž poznatky z ní vzešlé se vhodně prolínají s dalšími vzdělávacími obory.

2. Branná výchova – zastaralé, nebo znovu aktuální téma?

Branná výchova je pojem, se kterým se v 21. století setkáváme v odborné pedagogicko-didaktické debatě jen okrajově. Nicméně pro mnohé, kteří byli ve školních lavicích nebo za katedrami mezi 70. až 80. lety 20. století, tento pojem evokuje odborná i praktická cvičení v tématech souvisejících s možností vzniku vojenských konfliktů a dalších bezpečnostních rizik, často opředená politickou ideologií dané doby. Pokud si ale odmyslíme ideologické pozadí, možná si vybavíme, co dělat při chemickém poplachu či zvýšeném výskytu ionizujícího záře-

ní. Víme, kam máme běžet do krytu, či jak si rychle nasadit plynovou masku a další ochranné pomůcky. A řada z nás také tuší, jaké dopady mají různé zbraně hromadného ničení na naše zdraví.

Branná výchova byla součástí školních osnov až do roku 1991. Poté z nich vymizela a v současnosti související témata procházejí více vzdělávacími obory, resp. oblastmi vzdělávacích programů na různých úrovních¹. Od roku 2013 (cit.^{2,3}) byla branná výchova do jisté míry nahrazena vzdělávacím okruhem „Ochrana člověka za mimořádných událostí“ ve vzdělávací oblasti Člověk a zdraví^{4,5}.

Přibližně od roku 2018 se názory na potřebnost zařazení branné výchovy do výuky opět více akcentují, a to i ve veřejných médiích (viz např.⁶⁻⁸). Ovšem záměrem Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy (dále MŠMT) je stávající vzdělávací programy spíše zeštíhlovat (ve smyslu vzdělávacího obsahu), a tak je zařazení branné výchovy do nově revidovaných vzdělávacích programů více než nejisté. Důvodem přitom není skutečnost, že téma branné výchovy, tedy přenos teorie i praxe související s chováním v různých typech situací ohrožujících lidské zdraví a život, nepovažují zástupci MŠMT za podstatné, ale jednoduše proto, že nezapadá do jejich koncepce revize kurikula.

Nehledě na případné znovuzařazení branné výchovy do kurikula mají školy poskytující všeobecné vzdělávání (při naplňování vzdělávacího obsahu „Ochrana člověka za mimořádných událostí“) stále povinnost žáky naučit základním vědomostem a dovednostem umožňujícím jim zachovat se adekvátně v jakékoli mimořádné situaci, se

kerou se mohou v běžném životě potkat. Ať už se jedná o živelní pohromy, havárie, teroristické útoky či dokonce vojenské konflikty.

3. Možnosti pojetí mezioborového tématu ve výuce chemie

Jak tedy propojit vzdělávací obor „Výchova ke zdraví“ s akcentem na vzdělávací obsah okruhu „Ochrana člověka za mimořádných událostí“ s dalšími vzdělávacími obory, především ze vzdělávacích oblastí „Člověk a příroda“ a „Člověk a společnost“?

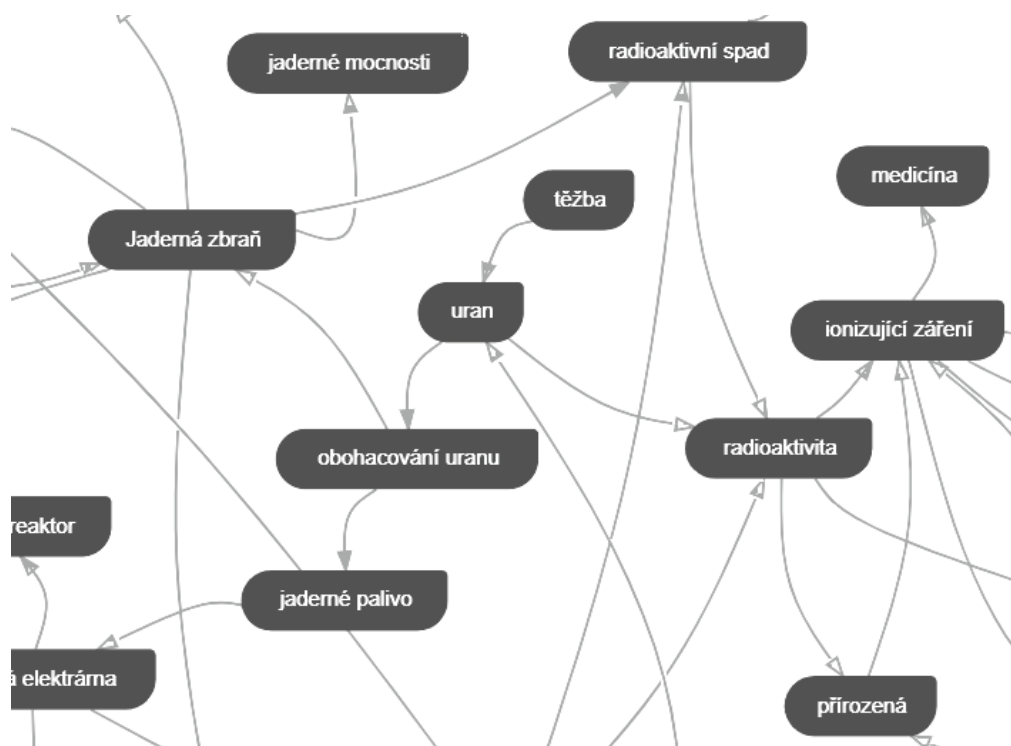
I když způsobů, jak zařadit téma do výuky, může být mnoho, z našeho pohledu je vhodné, v souladu s dalšími autory, aktivní zapojení žáků do výuky^{9,10}. Jako vhodná metoda se zde jeví projektové vyučování, ve kterém lze vhodně využít mezipředmětových vztahů při zpracování daného tématu^{10,11}. Díky šíří tématu se daří zapojit aktivně více žáků, i těch, kteří o přírodovědné obory nemají tak velký zájem.

První fází projektu je tvorba myšlenkové mapy (viz obr. 1), kterou je vhodné tvořit s celou třídou. Vyučující činnost moderuje, zároveň však získává velmi cennou zpětnou vazbu nejen o dosavadních žákovských znalostech, ale i o jejich prekonceptech a miskonceptech^{12,13}. Již v této fázi má vyučující možnost opravit žákovské pojetí hierarchie a vztahů mezi pojmy v myšlenkové mapě. Námí

navržená myšlenková mapa je pro vyučující dobrým vodítkem k tomu, jaká témata mohou být do projektu zařazena.

Dalším krokem je rozdělení žáků do šesti skupin, přičemž každá skupina volí některé z témat z oblasti chemie, fyziky, biologie a výchovy ke zdraví, chování za mimořádných událostí, geografie a společenskovední oblasti. Z naší zkušenosti víme, že žáci mají v některých případech problém vybrat informace, které jsou pro dané téma skutečně stěžejní. Proto je každé ze skupin přidělen systém návodných otázek, které pro projekt musí zpracovat. Systém návodných otázek je uveden v tab. I. Otázky žáci zpracovávají formou komentovaného posteru, prezentace nebo videoprezentace, případně následně příspěvku do sborníku, pokud projekt simuluje studentskou konferenci. Podmínkou úspěšného celotřídního projektu je, aby mezi sebou skupiny komunikovaly a výsledné ztvárnění tématu bylo konzistentní. To znamená, aby na sebe jednotlivé bloky vzájemně navazovaly a doplňovaly se. K tomu napomáhá právě myšlenková mapa, kterou mají žáci stále k dispozici.

Další oporu, kterou nabízí tento příspěvek, je soubor vhodných zdrojů pro čerpání informací o daném tématu. Jistě lze namítat, že práce s literaturou má být jednou z podstatných dovedností, kterou žáci mohou v rámci projektu samostatně rozvíjet. My však argumentujeme tím, že pokud vyučující zjistí, že žáci mají řadu mylných prekonceptů, nebo dokonce miskonceptů, které se týkají uvede-



Obr. 1. Příklad myšlenkové mapy (výřez) k tématu jaderná energie a jaderné zbraně (dostupné na: <https://app.contextminds.com/?m=vvK6Z>)

Tabulka I

Návodné otázky k jednotlivým oblastem pojmové mapy tříděné podle vzdělávacích oborů

Vzdělávací obor	Otázky
Chemie	<p>Nachází se uran v přírodě elementární či ve sloučeninách (případně jakých)? Jaký je poměr dvou nejběžnějších izotopů uranu v přírodě? Jaké jsou jejich poločasy přeměny? Na jakém principu fungují jaderné zbraně? V čem se princip jaderných zbraní shoduje nebo liší od principu fungování jaderného reaktoru? Jak a proč probíhá svržení atomových zbraní? Co jsou tzv. izotopické zbraně neboli „špinavé“ bomby a jaký je rozdíl oproti jaderným zbraním? Co je to obohacený uran? A o co se vlastně obohacuje? Jak a proč se přírodní uran obohacuje? Jak se liší obsah obohaceného uranu v jaderném reaktoru a v jaderných zbraních? Na jakou sloučeninu se převádí uran z přírodních zdrojů před procesem obohacování? A proč? Jak se dále již obohacený uran zpracovává?</p>
Fyzika	<p>Čím se od sebe liší tzv. přirozená a umělá radioaktivita? Co je tzv. záření z přírodního pozadí? Jaké je přírodní radiační pozadí v ČR a jinde ve světě? Porovnejte roční ozáření průměrného obyvatele ČR s dávkami při jednorázových zdravotnických vyšetřeních (RTG, CT apod.). Popište rozdíl mezi radioaktivní přeměnou a štěpnou reakcí. Jaké typy záření vznikají při radioaktivních přeměnách či jaderném štěpení? Proč se záření uvolněnému při radioaktivní přeměně říká ionizující? V jakých veličinách (a jednotkách) se měří a proč jsou důležité: Dávkový ekvivalent? Absorbovaná dávka záření? Vyhledej tři příklady prospěšného využití radioaktivity. Jak se nazývá a jak funguje přístroj na měření radioaktivity (ionizujícího záření)?</p>
Biologie a Výchova ke zdraví	<p>Jaký vliv má ionizující záření na živé organismy? Jak může záření postihnout lidský organismus na buněčné úrovni? Co je biologická dozimetrie? Co je to radioaktivní spad (mrak) a jak působí na člověka? Které radionuklidy (vznikající při jaderných mimořádných událostech) jsou pro člověka nebezpečné a proč? Jak souvisí profylaxe jodidovými tabletami s jadernými mimořádnými událostmi? Kdy je jodová profylaxe užitečná? Může mít také negativní zdravotní důsledky? Vyberte si jedno z medicínských vyšetření, které využívá ionizující záření, a stručně ho představte.</p>
Chování za mimořádných událostí	<p>Jaká jsou ochranná opatření při radiační události? Co má obsahovat evakuační zavazadlo? Jaké prostředky improvizované ochrany osob lze využít v prostředí zamořeném radioaktivitou, chemickými či biologickými látkami? Jak se tato zamoření liší a co mají společného? Kde (internetové stránky/média) získáváme informace během mimořádných událostí, při nichž nám není umožněno opuštění vnitřních prostor (např. bytu, kanceláře)? Jak fungují a kolik stojí ochranné obleky? Lze se bránit účinkům ionizujícího záření z jaderných zbraní? Jak? Jaké úřady v ČR dohlíží na bezpečnost při provozování jaderných elektráren a na radiační ochranu obyvatelstva?</p>
Geografie	<p>Kde se nachází (ve světě i v ČR) přírodní zdroje pro možnou výrobu jaderných zbraní? Které státy disponují jadernými zbraněmi? Znázorněte je na mapě. Jaké má držení jaderných zbraní dopad na geopolitickou situaci v oblasti? Co je to radioaktivní mrak a jak se v atmosféře pohybuje? Je držení jaderných zbraní nějak regulováno? Jak, proč a co je cílem? Mají jaderné zbraně i nějaká pozitiva? Kde a jak je skladováno čerstvé/vyhořelé jaderné palivo v ČR? V současné době je v ČR plánované hlubinné úložiště radioaktivního odpadu. Jaké jsou vytipované lokality a jaké podmínky musí splňovat?</p>

Tabulka I
Pokračování

Vzdělávací obor	Otázky
Společenskovední oblast (Občanský a společenskovední základ, Dějepis)	<p>Jaký efekt na vnímání jaderné energie mělo použití jaderných zbraní? Kde byly jaderné zbraně v historii použity? Dokumentujte konkrétními údaji a zajímavostmi. Jak souvisí Kubánská (Karibská) krize a jaderné zbraně? Diskutujte, proč jsou jaderné zbraně tak obávané. Srovnajte je např. i s konvenčními zbraněmi (případně i chemickými a biologickými). Jak souvisí termín Nashova rovnováha a jaderné zbraně? Jaké další (nejen) vojenské oblasti se obvykle rozvíjí spolu s jaderným programem? Proč? Jaké jsou podle vás přínosy filmu <i>Oppenheimer</i> (2023) pro širší společnost? Diskutujte. Jak byla radioaktivita objevena? Kdo se o její objev a popis zasloužil?</p>

ných témat, mohou je posílit vyhledáním dalších mylných informací. V tomto případě doporučujeme dát žákům k dispozici seznam zdrojů, ze kterých mohou/mají čerpat (viz tab. II).

Práci na projektu doporučujeme věnovat minimálně tři vyučovací hodiny, přičemž během prezentací vyučující koriguje případné chyby, identifikuje, zda primární pre-koncepty, případně miskoncepty byly odstraněny. Kromě získání základních poznatků se díky tzv. transformativnímu učení u žáků rozvíjí rovněž afektivní složka jejich osobnosti, tj. utváří své hodnotové systémy a od nich se odvíjí jejich postoje^{14,15}.

4. Pilotáž navrženého projektu

Pilotáž byla realizovaná v 6. ročníku (sextě) osmiletého gymnázia v předmětu Chemie. Přítomno bylo 20 žáků. Žáci byli nejprve seznámeni se záměrem a časovou realizací projektu a zvolili si prioritu vzdělávacích oblastí (viz tab. I). Učitel poté rozřadil žáky do skupin dle jejich priorit (podařilo se, že všichni žáci získali téma 1. nebo 2.

volby). Zpracování své části věnovali žáci dvě vyučovací hodiny, připravili si ústní vystoupení v délce cca 5 minut, včetně jedné otázky do diskuse a stručné argumentace, proč by měl „běžný“ člověk o dané oblasti aspoň něco znát. Své téma týkající se jaderných zbraní či ionizujícího záření zpracovali formou posteru o rozměru A3. Třetí vyučovací hodinu proběhly prezentace a diskuse, evaluace byla uskutečněna na začátku další hodiny.

Na základě zpětné vazby (překrývání témat v různých oblastech) byly upraveny (konkretizovány) otázky v tab. I. Při reflexi žáci ocenili zejména možnost volby tématu spadajícího do různých oblastí vzdělávání, náhled na téma „radioaktivity“ z různých úhlů pohledu a smysluplně strávený čas (práce je bavila). Pro část žáků bylo náročné vhodné rozvržení času na dílčí úkoly; promyšlení, jak téma uchopit, aby nebylo pro spolužáky příliš povrchní ani příliš detailní. Pro některé bylo rovněž složité vybrat informace, které by měly být umístěny na poster s ohledem na časový limit. Z pohledu vyučujícího však tyto obavy byly zbytečné. Žákovské postery i prezentace byly v dobré kvalitě.

Tabulka II
Doporučené zdroje pro zodpovězení vybraných návodných otázek

Vzdělávací obor	Zdroj
Biologie Výchova ke zdraví	Státní úřad pro jadernou bezpečnost (2023). <i>Stručný přehled biologických účinků záření</i> . Online, https://www.sujb.cz/radiacni-ochrana/oznameni-a-informace/strucny-prehled-biologickych-ucinku-zareni/ , staženo 8. 8. 2023.
Chování za mimořádných událostí	Ministerstvo vnitra ČR (2003). <i>Pro případ ohrožení : Příručka pro obyvatele</i> . Online, https://www.mvcr.cz/clanek/pro-pripad-ohrozeni-prirucka-pro-obyvatele.aspx , staženo 8. 8. 2023. Státní úřad pro jadernou bezpečnost (2023). <i>Ochranná opatření při radiační mimořádné události</i> . Online, https://www.sujb.cz/radiacni-ochrana/oznameni-a-informace/ochranna-opatreni-pri-radiacni-mimoradne-udalosti/ , staženo 8. 8. 2023.
Zeměpis	Třípól (2021). <i>Jaderná fyzika a energetika: Uran v roce 2021. Průvodce cenou, hodnotou a využitím komodity</i> . Online, https://www.3pol.cz/cz/rubriky/jaderna-fyzika-a-energetika/2667-uran-v-roce-2021-pruvodce-cenou-hodnotou-a-vyuzitim-komodity , staženo 8. 8. 2023.
Společenskovední oblast (Občanský a společenskovední základ, Dějepis)	Státní úřad pro jadernou bezpečnost (2023). <i>Výročí 70 let od bombardování Hirošimy a Nagasaki</i> . Online, https://www.sujb.cz/fileadmin/sujb/docs/aktualne/roll_up_JZ_final.pdf , staženo 8. 8. 2023.

5. Závěr

Integrovaný přístup k výuce multioborových témat je pro vyučující vždy náročný. Proto jsme vytvořili návod k tomu, jak ve výuce pracovat s aktuálním tématem jaderných zbraní ve středním všeobecném vzdělávání. Náš přístup umožňuje naplňovat vzdělávací obsah (nejen) výuky chemie, jak je stanoven v RVP, ale přispívá rovněž k realizaci tématu Ochrana člověka za mimořádných událostí. Věříme, že úvodní teoretické vymezení, myšlenková mapa, systém konkrétních návodných otázek i seznam aktuálních zdrojů práce vyučujících usnadní a umožní tak realizaci projektu zaměřeného na velmi aktuální téma. Naše zkušenost ukazuje, že téma žáky baví i zajímá, a díky multidisciplinárnímu přístupu zaujme i ty žáky, kteří preferují společenskovědní obory před obory přírodovědnými. Důležité však je, že i bez ohledu na oborové preference si žáci odnášejí na konci projektu poměrně komplexní představu o daném tématu. Kromě toho se rozvíjejí jejich komunikační kompetence a získávají dovednosti spolupráce.

LITERATURA

1. Kyselák J., Rožňák P.: *Hist. Sociol.* 14, 129 (2022).
2. Tesařová R.: *Branná výchova a obrana státu v českém školství*. Masarykova univerzita, Brno 2016.
3. Kirsch L., Padmos J.: *Vojen. Rozhl.* 22, 168 (2013).
4. MŠMT. RVP G. <https://www.edu.cz/rvp-ramcove-vzdelavaci-programy/ramcove-vzdelavaci-programy-pro-gymnazia-rvp-g/> (2007), staženo 1. 8. 2023.
5. MŠMT. RVP ZV. <https://www.msmt.cz/file/60264/> (2023), staženo 1. 8. 2023.
6. Hrdinová R.: Válka o brannou výchovu. Ministerstva se přou o nový předmět. *IDNES.cz* (7. 6. 2018), https://www.idnes.cz/zpravy/domaci/branna-vychova-stat-bezpecnost-slechtova-ano-cssd-ministerstvo-skolstvi-obrana.A180606_211347_domaci_evam, staženo 1. 8. 2023.
7. Brzybohatá A., Mráčková K.: Ve školách chybí branná výchova. Děti umí telefonní čísla, ve zbytku tápou. *Pedagogicke.info* (29. 4. 2019), <https://www.pedagogicke.info/2019/04/anna-brzybohata-karla-mrackova-ve.html?view=flipcard>, staženo 1. 8. 2023.
8. PrahaIN: Branná výchova se vrací do škol, požaduje to ministerstvo obrany (9. 3. 2022), <https://www.prahain.cz/zivot-ve-meste/branna-vychova-se-vraci-do-skol-pozaduje-to-ministerstvo-obrany-4002.html>, staženo 1. 8. 2023.

9. Grecmanová H., Urbanovská E.: *Aktivizační metody ve výuce, prostředek ŠVP*. HANEX, Olomouc 2007.
10. Skalková J.: *Obecná didaktika*. GRADA, Praha 2007.
11. Boss S., Larmer J.: *Project Based Teaching: How to Create Rigorous and Engaging Learning Experiences*. ASCD, Alexandria 2018.
12. Kambouri M.: *European Early Childhood Education Research Journal* 24, 907 (2015). doi: 10.1080/1350293X.2014.970857, staženo 8. 8. 2023
13. Usta N. D., Ayas A.: *Procedia - Soc. Behav. Sci.* 2, 1432 (2010).
14. King K. P.: *Innov. High. Educ.* 29, 155 (2004).
15. Kitchenham A.: *Journal of Transformative Education* 6, 104 (2008). doi: 10.1177/1541344608322678, staženo 8. 8. 2023.

P. Teplý^a, S. Janoušková^a, and P. Distler^{a,b}
^a Department of Teaching and Didactics of Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague,
^b Department of Nuclear Chemistry, Faculty of Nuclear Sciences and Physical Engineering, Czech Technical University, Prague, Czech Republic): **Integration of Military Education into the Teaching of (not only) Chemistry: Radioactivity and Nuclear Weapons**

Human protection in emergencies is a compulsory educational content in the Czech Republic loosely related to the former military education. It offers a very wide range of topics that can be included not only in chemistry education, but also in other (not only) natural sciences. For example, it is very suitable to include it as a (short- or medium-term) project focused on radioactivity and nuclear weapons, which is of interest to the students. For this purpose, we have created a concept map and guiding questions, as well as a list of recommended sources of information that teachers and their pupils can use. The aim of the project is not only to gain new knowledge and understanding, but also to gain holistic insight into the topic through cross-curricular educational approach.

Keywords: defense education, radioactivity and ionizing radiation, nuclear weapon, chemistry education



Užití tohoto díla se řídí mezinárodní licencí Creative Commons Attribution License 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.cs>), která umožňuje neomezené využití, distribuci a kopírování díla pomocí jakéhokoliv média, za podmínky řádného uvedení názvu díla, autorů, zdroje a licence.

VÝZNAMNÁ DATABÁZE NEBEZPEČNÝCH LÁTEK MEDIS-ALARM V ČESKÉ REPUBLICĚ

OTAKAR JIŘÍ MIKA, LUBOMÍR POLÍVKA, KAREL MALINOVSKÝ a TOMÁŠ MATÝS

^a Policejní akademie České republiky v Praze, Fakulta bezpečnostního managementu, Lhotecká 559/7, P. O. Box 54, 143 01 Praha 4, ^b Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zdravotně sociální fakulta, J. Boreckého 1167/27, 370 11 České Budějovice, Česká republika
otakar_mika@email.cz

Došlo 2.1.24, přijato 23.1.24.

Článek se zabývá problematikou nebezpečných chemických látek v souvislosti s využitím české databáze nebezpečných látek Medis-Alarm. Databáze Medis-Alarm je v tomto příspěvku charakterizována a jsou naznačeny možnosti jejího využití na vysokých školách při výuce studentů. Dalším cílem je vyvolat diskusi o nutném zvýšení bezpečnosti jak obyvatel, tak záchranářů a zlepšení ochrany životního prostředí v České republice.

Klíčová slova: nebezpečné chemické látky, Medis-Alarm, Integrovaný záchranný systém, výuka

Obsah

1. Úvod do problematiky nebezpečných chemických látek
2. Nebezpečné průmyslové chemické látky a směsi
3. Databáze nebezpečných chemických látek
4. Bezpečnostní listy nebezpečných chemických látek
5. Možnosti využití databáze nebezpečných chemických látek ve výuce na vysoké škole
6. Závěr

1. Úvod do problematiky nebezpečných chemických látek

Nebezpečné látky můžeme obecně rozdělit do tří hlavních skupin. Patří sem chemické látky, radioaktivní látky (radionuklidy) a biologické agens (látky). Uvedené skupiny se značně liší svými vlastnostmi, projevy a nebezpečností, způsoby detekce i ochranou člověka před jejich nepříznivým působením. Důležité je též znát možnosti jejich rychlé, spolehlivé a bezpečné likvidace. Zásadně je ovšem třeba vnímat významné fyziologické účinky jednotlivých nebezpečných látek na lidský organismus, případně zvířata a životní prostředí. Od mechanismu působení jednotlivých nebezpečných látek se pak odvíjí způsoby ochrany člověka. Ačkoliv radioaktivní a biologické látky mohou být velmi nebezpečné pro lidské životy a zdraví, počet těchto látek je relativně malý. Podstatně větší skupinu tvoří nebezpečné chemické látky a směsi, kam obecně patří bojové chemické látky (dříve nazývané také otravné látky nebo bojové otravné látky) a nebezpečné průmyslové chemické látky.

Tento příspěvek se zaměřuje na nekontrolované úniky nebezpečných chemických látek při chemických nehodách a haváriích, a to jak u stacionárních objektů a zařízení, tak i při silniční a železniční přepravě nebezpečných věcí podle mezinárodních dohod ADR (Evropská dohoda o mezinárodní silniční přepravě nebezpečného zboží) a RID (Řád pro mezinárodní železniční přepravu nebezpečných věcí). Je vhodné stručně připomenout, že bojových chemických látek a jejich různých směsí je známo již z období 1. světové války, kdy byly masově nasazeny, více jak 80. Jedná se většinou o vysoce toxické látky (někdy nazývané super-jedy), které byly vyvinuty přímo k usmrcování nebo zneschopňování lidí (vojáků)¹. V současné době jsou tyto vysoce nebezpečné látky zakázány Mezinárodní smlouvou o zákazu chemických zbraní z roku 1993 (cit.²), která vešla v platnost v roce 1997. Česká republika má vydán vlastní národní zákon³ a příslušnou prováděcí vyhlášku⁴ o zákazu chemických zbraní a bojových chemických látek. Těmito nebezpečnými látkami se příspěvek dále nezabývá.

Skupinu nebezpečných průmyslových chemických látek a směsí definuje tzv. „chemický zákon“⁵, se kterým úzce souvisí „zákon o prevenci závažných havárií“⁶, zahrnující v podstatě všechny nebezpečné průmyslové chemické látky a směsi. Za hlavní nebezpečné vlastnosti jsou u průmyslových chemických látek považovány jejich toxicita (jedovatost), výbušnost a hořlavost. Většina nebezpečných průmyslových chemických látek má pouze jednu hlavní nebezpečnou vlastnost (například pro chemické látky chlor a fosgen je typická toxicita). Jiné známé a rozšířené nebezpečné průmyslové chemické látky jako amoniak, oxid uhelnatý, kyanovodík a sirouhlík jsou toxické, výbušné i hořlavé. Jsou velmi nebezpečné nejen při výrobě, ale také při skladování, přepravě, manipulaci, a nako-

nec i při samotném použití. Toto klasické dělení nebezpečných průmyslových chemických látek uvádí mnoho domácích i zahraničních informačních zdrojů, jejichž podrobnější výčet je uveden v seznamu použité literatury. Tento příspěvek se zaměřuje na aspekty manipulace s těmito látkami z pohledu zvýšení bezpečnosti při jejich používání jak v průmyslovém měřítku, tak i v domácnostech.

Lze statisticky sledovat a případně následně vyhodnotit nekontrolované havarijní úniky nebezpečných látek v České republice? Statistická ročenka Generálního ředitelství Hasičského záchranného sboru České republiky (dále jen GŘ HZS ČR) vychází již 30 let (první ročenka vyšla v roce 1991) a kromě jiného v sobě zahrnuje nekontrolované úniky nebezpečných látek za hodnocený rok. Ve statistice jsou uvedeny dvě hlavní skupiny nehod, a to úniky pohonných hmot a úniky ostatních nebezpečných chemických látek. V minulé dekádě (roky 2012 až 2020) zpočátku docházelo k trvalému růstu těchto úniků a teprve od roku 2018 dochází k určité stagnaci – viz tab. I.

Úniky nebezpečné chemické látky jsou ve Statistických ročenkách GŘ HZS ČR definovány jako odborné zásahy u nepříznivých událostí spojených s nežádoucím uvolněním nebezpečných chemických látek včetně ropných produktů (během výroby, dopravy nebo manipulace, kdy na místo úniku musel vyjet na odborný zásah Hasičský záchranný sbor České republiky (HZS ČR)). Zásah HZS ČR se provádí k omezení nebo snížení rizika nekontrolovaného úniku hořlavých, výbušných, žíravých, jedovatých, zdraví škodlivých, radioaktivních a jiných nebezpečných látek, ropných produktů, případně ostatních látek do životního prostředí, včetně závažných havárií podle zákona o prevenci závažných havárií způsobených vybranými nebezpečnými chemickými látkami nebo chemickými směsmi, podle zákona č. 224/2015 Sb. (cit.⁶). Hlavním úkolem HZS ČR při takových zásazích je pochopitelně záchrana lidských životů, ochrana lidského zdraví (jako prvořadé a nejdůležitější úkoly) a potom také ochrana životního prostředí, uchránění poškození majetku apod.

2. Nebezpečné průmyslové chemické látky a směsi

Největší nebezpečí úniku nebezpečných látek hrozí při mimořádných událostech, jako jsou průmyslové nehody, havárie, požáry, výbuchy, dopravní nehody nebo živelní pohromy. Při těchto situacích může dojít k nekontrolovatelnému úniku nebezpečných chemických látek nebo

směsí, což může mít dopad na zdraví a životy obyvatel, zasahujících jednotek, životní prostředí a majetek. K podobným situacím může dojít také při teroristických útocích, při nichž mohou být zneužity nejen nebezpečné průmyslové chemické látky, ale hrozí i použití bojových chemických látek. Aby se co možná nejvyšší měrou zamezilo či předešlo těmto událostem spojených s nebezpečnými chemickými látkami, byl zaveden neoficiální pojem chemická bezpečnost.

Chemická bezpečnost předpokládá aktivní znalost souboru významných údajů o fyzikálně-chemických, chemických, toxikologických a jiných vlastnostech, které jasně charakterizují potenciální rizika veškerého nakládání s chemickými látkami a chemickými směsmi, a to včetně protipatření, která jsou základem pro krizové a havarijní plánování a řízení a vytvářejí komplex nouzové připravenosti pro daný okruh hrozeb. Je proto snaha ujednotit veškeré významné a nezbytné údaje o chemických látkách a zakotvit je v jednotné legislativě platné nejen pro oblast států Evropské unie, ale i celosvětově. K označování nebezpečných chemických látek se používají jak přesně definované piktogramy (speciální značky), tak i výstražné tabulky. Vlastnosti nebezpečných chemických látek a směsí, tak jak jsou uvedeny v tzv. „chemickém zákoně“ České republiky (zákon č. 350/2011 Sb., v paragrafu 5)⁵, jsou v tab. II.

3. Databáze nebezpečných chemických látek

Možností, jak získat potřebné důležité a věrohodné informace o účincích nebezpečných chemických či biologických a radioaktivních látek, jejich fyzikálních a chemických vlastnostech, toxikologických datech, používaných ochranných prostředcích, první pomoci při zasažení, způsobu likvidace, předepsaném označování, H-větách a P-větách a dalších užitečných údajích, je celá řada. Lze samozřejmě využít odbornou literaturu, vydané bezpečnostní listy nebezpečných chemických látek, různé tabulky, firemní katalogy a v neposlední řadě elektronické databázové systémy, které se v současné době jeví jako zcela nejvhodnější. Poskytují snadnou orientaci, rychle a přehledně zpracované potřebné a významné údaje, jsou pravidelně aktualizovány a doplňovány na základě vědeckého poznání a díky této aktualizaci mohou zahrnovat velké množství nebezpečných látek a relativně přesné údaje o těchto látkách.

Tabulka I

Nekontrolované havarijní úniky nebezpečných chemických látek a směsí v České republice v období 2012–2020 (níže jsou uvedeny počty úniků, aniž by byl specifikován jejich rozsah a závažnost)

Rok	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020
Počet úniků	5106	5253	6161	6693	6698	7304	7687	7798	7719

Tabulka II
Vlastnosti nebezpečných chemických látek a směsí

Skupiny látek jsou vyjmenovány v souladu s „chemickým zákonem“ České republiky (č. 350/2011 Sb.)	Osobní hrubé subjektivní hodnocení autorů článku ve čtyřech úrovních nebezpečí
Výbušné látky nebo směsi	vysoce nebezpečné
Oxidující látky nebo směsi	nebezpečné
Extrémně hořlavé látky nebo směsi	extrémně nebezpečné
Vysoce hořlavé látky nebo směsi	vysoce nebezpečné
Hořlavé látky nebo směsi	nebezpečné
Vysoce toxické látky nebo směsi	extrémně nebezpečné
Toxické látky nebo směsi	vysoce nebezpečné
Zdraví škodlivé látky nebo směsi	nebezpečné
Žíravé látky nebo směsi	nebezpečné
Dráždivé látky nebo směsi	málo nebezpečné
Senzibilující látky nebo směsi	málo nebezpečné
Karcinogenní látky nebo směsi	nebezpečné
Mutagenní látky nebo směsi	nebezpečné
Látky nebo směsi toxické pro reprodukci	nebezpečné
Látky nebo směsi nebezpečné pro životní prostředí	nebezpečné

Cenným zdrojem získávání potřebných dat o nebezpečných chemických látkách jsou databáze nebezpečných chemických látek. Databází nebezpečných průmyslových chemických látek existuje v České republice celá řada. Samotní hasiči České republiky pak uvádějí, že databáze nebezpečných látek Medis-Alarm je nejrozšířenějším systémem v České republice u této základní složky IZS (Integrovaného záchranného systému). Zde je stručně uvedena charakteristika této databáze.

Databáze Medis-Alarm, jejímž producentem je česká firma, obsahuje přibližně 10 000 záznamů nebezpečných chemických látek a je vytvářena již od roku 1991. Jejím původním základem byl seznam přibližně tří tisíc látek a nebezpečných věcí dle dohody RID a postupem času byly přidávány další látky, které figurují v české a evropské legislativě upravující nakládání s nebezpečnými látkami a směsmi. Databáze je určena zejména složkám záchranného systému a výrobním podnikům, ale i distributorům chemických látek, úřadům státní správy, studentům a dalším. Používá multi-kriteriální vyhledávání (aktuálně zahrnuje kolem čtyřiceti kritérií) a její součástí jsou rovněž hygienické limity, uznávaná doporučení, příznaky otrav, pokyny pro ošetření a propojení s českou, slovenskou a evropskou legislativou. Demoverze databáze nebezpečných látek Medis-Alarm je dostupná na webové stránce www.medisalarm.cz. Ukázka jednoho „okna“ databáze je uvedena na obr. 1

4. Bezpečnostní listy nebezpečných chemických látek

Všechny nebezpečné chemické látky a směsi uváděné na trhu musí mít podle zákonů zpracovány bezpečnostní listy. Tyto listy obsahují souhrn všech důležitých informací o dané látce, jako jsou např. složení dané látky, pokyny pro poskytnutí první pomoci, opatření pro hasební zásahy, opatření v případě náhodného úniku, skladování, údaje týkající se ochrany a bezpečnosti osob a další významné bezpečnostní a jiné informace. Každý bezpečnostní list obsahuje povinných 16 položek. Při čerpání automobilového benzínu nebo motorové nafty do osobního vozidla si lze na čerpací stanici bezpečnostní list vyžádat a podrobně se s ním seznámit. Hlavní smysl těchto listů je, aby uživatel před manipulací s nebezpečnou chemickou látkou byl obeznámen s pravidly a riziky týkajícími se dané látky. Bezpečnostní list umožňuje uživatelům učinit nezbytná opatření týkající se ochrany lidského zdraví a bezpečnosti při práci a ochrany životního prostředí. Zpracovatel bezpečnostního listu musí informovat uživatele o nebezpečnosti chemické látky nebo směsi a poskytnout informace o jejím bezpečném skladování, manipulaci a odstraňování.

Výrazným označením nebezpečnosti chemických látek jsou především grafické symboly uváděné na obalech. Smyslem je, aby byl uživatel včas a dostatečně informován o možných rizicích spojených s danou látkou. Kromě grafických symbolů se používají také jejich hmatatelné ekvivalenty, umožňující identifikovat nebezpečnost látek i osobám nevidomým nebo se zhoršeným zrakem. Společně s grafickými nebo hmatovými symboly jsou také používána signální slova, např. varování nebo nebezpečí.

The screenshot shows the Medis-Alarm 121A database interface for the chemical 1-CHLOR-2,4-DINITROBENZEN. The interface is organized into several sections:

- Identification:** Lists CAS (97-00-7), EINECS (202-551-4), and REACH (610-003-00-4) numbers. It also includes the molecular formula C₆H₄ClN₂O₄ and various hazard and precautionary statements (H and P).
- Classification:** Shows hazard statements such as Acute Tox. 3 (H301), Acute Tox. 2 (H310), and Acute Tox. 3 (H331), along with environmental and aquatic hazard statements.
- Safety Information:** Includes signal words (Nebezpečí), hazard pictograms (GHS06, GHS08, GHS09), and safety pictograms (F2).
- Chemical Structure:** A 2D chemical structure of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene is shown, featuring a benzene ring with a chlorine atom at position 1 and nitro groups at positions 2 and 4.
- Additional Information:** A table at the bottom provides details on regulatory codes (ADR, RID, IMDG, IATA) and specific safety measures (HAZCHEM 2017, ERG 153).

Obr. 1. Ukázka jednoho výstupu z databáze Medis-Alarm

Kromě grafických symbolů a signálních slov se používají také tzv. bezpečnostní věty, pokyny a doplňkové informace. Smyslem vět je podrobněji informovat uživatele o možných rizicích (H-věty) a doporučených postupech pro bezpečné zacházení či chování v případě incidentu (P-věty). H-věty (z angl. Hazard statements) jsou standardní věty o nebezpečnosti chemických látek a jejich směsí. Jsou součástí Globálně harmonizovaného systému klasifikace a označování chemikálií a nahrazují dřívější R-věty se stejným účelem a obdobným obsahem. P-věty (z angl. Precautionary statements) jsou standardizované pokyny pro bezpečné zacházení s chemickými látkami a jejich směsmi. Jsou opět součástí Globálně harmonizovaného systému klasifikace a označování chemikálií a nahrazují dřívější S-věty se stejným účelem a obdobným obsahem.

5. Možnosti využití databáze nebezpečných chemických látek ve výuce na vysoké škole

Autoři tohoto textu plédují pro zavedení databází nebezpečných chemických látek jako součást výuky na bezpečnostních oborech vysokých škol v České republice. V bezpečnostní praxi se s databázemi nyní pracuje častěji než s literaturou. Možností využití databází nebezpečných chemických látek je na vysokých školách celá řada. Předně je nutno zdůraznit, že přednáška týkající se databáze nebezpečných chemických látek sice může studentům

nabídnout určitý soubor základních vědomostí o možnostech a využití informací o nebezpečných chemických látkách, ale rozhodně nelze počítat s tím, že studenti získají v této fázi výuky potřebné dovednosti. Umožnit studentovi získání vybraných dovedností pro aktivní použití databáze nebezpečných chemických látek by mělo být cílem akademického pracovníka, který tuto bezpečnostní problematiku vyučuje a ideální formou výuky jsou pak odborné semináře, nejlépe ve speciální počítačové učebně, kde se každý student může s databází nebezpečných chemických látek důkladně seznámit. První autor článku vyučoval tuto bezpečnostní problematiku na vysoké škole, kde v semináři zadával jednoduché pracovní odborné úkoly, při kterých se studenti aktivně „potýkali“ s databází nebezpečných chemických látek a to v různých oblastech, jako jsou vlastnosti nebezpečných chemických látek, poskytování první pomoci po zasažení, hašení požárů, ochrana osob před účinky nebezpečných chemických látek apod. Zjednodušeně je možno říci, že student samostatně hledá/listuje v databázi nebezpečných chemických látek a vyhledává požadované informace a podklady pro zpracování zadaného úkolu. Tím se pochopitelně podrobně seznamuje s její strukturou, obsahem a možnostmi jejího rychlého a účelného využití v praxi. Další důležité použití databáze je pak možné při zpracování studentských kvalifikačních prací, jako jsou bakalářské a diplomové práce, případně jako podkladový materiál pro řešení specifických vědecko-výzkumných bezpečnostních projektů na vysokých školách.

6. Závěr

Nebezpečné chemické látky jsou na mnoha místech kolem nás. Jejich fyzikální, chemické, toxikologické a další významné vlastnosti jsou pochopitelně značně rozdílné a mnohdy mohou být tyto látky až extrémně nebezpečné pro život a zdraví. Je proto důležité mít přístup a dovednosti k rychlému získání potřebných informací o těchto látkách. V České republice existuje mobilní aplikace Databáze nebezpečných chemických látek Medis-Alarm určená pro HZS ČR s obsahem 10 tisíc nebezpečných chemických látek. S touto databází má přímou souvislost v České republice již roky provozovaný a osvědčený systém TRINS (transportní, informační a nehodový systém), který byl založen v roce 1996. Daný příspěvek si klade za cíl podpořit diskusi o nutném a potřebném zvýšení bezpečnosti jak obyvatelstva, tak také zasahujících záchrannářů a zkvalitnění ochrany životního prostředí v České republice.

LITERATURA

1. Mika O. J.: Historie a vojenství č. 6, 153 (1993).
2. *Mezinárodní úmluva o zákazu vývoje, výroby, hromadění zásob a použití chemických zbraní a o jejich zničení*. 1993. OSN, Paris. https://www.sujb.cz/fileadmin/sujb/docs/zakaz-zbrani/Umluva_CW.pdf, staženo 31. srpna 2023.
3. Zákon č. 19/1997 Sb. *o některých opatřeních souvisejících se zákazem chemických zbraní a o změně a doplnění zákona č. 50/1976 Sb. o územním plánování a stavebním řádu (stavební zákon)*, ve znění pozdějších předpisů, zákona č. 455/1991 Sb. *o živnostenském podnikání (živnostenský zákon)*, ve znění pozdějších předpisů, a zákona č. 140/1961 Sb. *restriční zákon*, ve znění pozdějších předpisů. <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/1997-19?text=>, staženo 31. srpna 2023.
4. Vyhláška Státního úřadu pro jadernou bezpečnost č. 459/2020 Sb. *o provádění opatření souvisejících se zákazem chemických zbraní*. <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2020-459?text=>, staženo 31. srpna 2023.
5. Zákon č. 350/2011 Sb. *o chemických látkách a chemických směsích a o změně některých zákonů (chemický zákon)*. <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2011-350?text=>, staženo 31. srpna 2023.
6. Zákon č. 224/2015 Sb. *o prevenci závažných havárií způsobených chemickými látkami a směsmi (zákon o prevenci závažných havárií)*. <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2015-224?text=>, staženo 31. srpna 2023.

7. Čapoun T. a spol.: *Chemické havárie Ministerstvo vnitra*. Generální ředitelství Hasičského záchranného sboru České republiky, Praha 2009.
8. Mika O. J., Polívka L.: *Radiační a chemické havárie*. Policejní akademie České republiky v Praze, Fakulta bezpečnostního managementu, Katedra krizového řízení, Praha 2010.
9. Mika O. J., Lacina P.: *Hlavní bezpečnostní aspekty nebezpečných chemických látek. ExFoS – Expert Forensic Science. 25. Mezinárodní vědecká konference soudního inženýrství, 29. a 30. ledna 2016*, s. 435. Ústav soudního inženýrství, Vysoké učení technické v Brně, Brno 2016.
10. Mika O. J., Lacina P.: *Toxikologické a zdravotní aspekty nebezpečných chemických látek. 3. a 4. února 2016. Ochrana obyvatelstva – zdravotní záchrannářství 2016*, s. 69. Sdružení požárního a bezpečnostního inženýrství, Ostrava 2016.
11. Lacina P., Mika O. J., Šebková K.: *Nebezpečné chemické látky a směsi*. Masarykova univerzita, Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí, Brno 2013.
12. Polívka L., Mika O. J., Sabol J.: *Nebezpečné chemické látky a průmyslové havárie*. Policejní akademie České republiky v Praze, Fakulta bezpečnostního managementu, Katedra krizového řízení, Praha 2017.
13. MEDISTYL, s.r.o. *Medis-Alarm – databáze nebezpečných látek: manuál. Verze 121A*. Praha 2021.

O. J. Mika^{a,b}, L. Polívka^a, K. Malinovský^a, and T. Matýs^a (^aPolice Academy of the Czech Republic in Prague, Faculty of Security Management, Department of Crisis Management, Czech Republic, ^bUniversity of South Bohemia in České Budějovice, Faculty of Health and Social Sciences, Czech Republic): **Medis-Alarm Significant Database of Hazardous Substances in Czech Republic**

This article deals with the security of the population and the fire brigade, which uses the Czech database of hazardous substances, Medis-Alarm. This database is connected with the long-term operation of the proven safety transport system TRINS (transport, information and accident system) in the Czech Republic. The Medis-Alarm database is the most widespread one used in the Czech Republic. In this paper, this database is therefore characterized and described in detail, and various possibilities of its use at universities are indicated. The article also aims to provoke a public professional discussion on the necessary increase of the safety of both the population and rescuers and the improvement of environmental protection in the Czech Republic.

Keywords: hazardous chemical substances, medis-alarm, integrated rescue system, teaching



Užití tohoto díla se řídí mezinárodní licencí Creative Commons Attribution License 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.cs>), která umožňuje neomezené využití, distribuci a kopírování díla pomocí jakéhokoliv média, za podmínky řádného uvedení názvu díla, autorů, zdroje a licence.

76. Sjezd chemiků

Ostrava

kampus VŠB-TUO

26. - 29. 8. 2024



<https://www.76sjezdchemiku.cz/>

ASOCIACE MLADÝCH CHEMIKŮ

27 1,887 3,26 1,83 75 19 3,04 58 1,12
CoNFeReNce
58,933 4,00 55,845 186,21 14,00 140,12

ROSTEME S CHEMIÍ

27. - 28. ČERVNA 2024 | PRAHA

PŘÍRODOVEDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY

REGISTRACE DO 30. DUBNA

ABSTRAKT DO 27. KVĚTNA

STAŇ SE
ČLEMEM ČSCH



REGISTRUJ SE



**PŘIPOJ SE K NÁM
A OBJEV SVĚT
CHEMIE!**

**ASOCIACE MLADÝCH
CHEMIKŮ**

CO NABÍZÍME?

VZDĚLÁVÁNÍ: WORKSHOPY, SEMINÁŘE

NETWORKING: BUDUJ SÍŤ SPOJENÍ
MEZI MLADÝMI CHEMIKY

SPOLEČENSKÉ UDÁLOSTI:
KONFERENCE, SOUTĚŽE

**STAŇ SE
ČLEMEM AMCH**



**SLEDUJ NÁS
ONLINE**



**ZAPOJ SE DO ORGANIZACE AKCÍ
ASOCIACEMCSCH@GMAIL.COM**

Veletřh analytica 2024 Mnichov ukáže laboratorní svět zítřka:

Veletřhu se zúčastní všichni lídři trhu

Vysoký nárůst počtu vystavovatelů ze zahraničí

Nabitý doprovodný program s konferencemi a odbornými fóry

Top témata veletřhu: digitální transformace naživo



Ve dnech 9. až 12. dubna se mezinárodní laboratorní průmysl znovu sejde na veletřhu analytica v Mnichově. Přední světový veletřh laboratorní techniky, analytiky a biotechnologie pokrývá celé spektrum laboratoří v průmyslu a výzkumu a klade velký důraz na výměnu odborných znalostí pro vědu a praxi.

Laboratoře 4.0: Laboratory & Analytical Device Standard nebo zkráceně LADS se nedávno stal dostupným komunikačním standardem, který propojuje softwarové systémy, analýzy a laboratorní zařízení od různých poskytovatelů. „Digitální transformace laboratorního světa neúprosně postupuje. Komunikace zařízení nezávislá na výrobci nyní výrazně urychlí vývoj“, zdůrazňuje Susanne Grödl, zástupkyně ředitele pro analytiku veletřhu Messe München. „Zveme Vás k návštěvě veletřhu analytica, kde nahlédnete do síťově propojené laboratoře budoucnosti“. Speciální show analytica Digital Transformation v hale B2 ukazuje, jak lze díky bezproblémové komunikaci zařízení implementovat plně automatizované laboratorní procesy, od digesce vzorků až po analýzy a hodnocení. Veškeré podrobnosti o LADS jsou k dispozici také na stánku průmyslového sdružení SPECTARIS, které sehrálo klíčovou roli ve vývoji komunikačního standardu plug-and-play.

Jedním z vrcholů speciální show **analytica Digital Transformation** bude autonomní laboratorní robot Kevin, který přebírá především rutinní úkoly pro laboratorní personál. Kevin může přepravovat vzorky a dodávat systémy s čidly, špičkami pipet a mnoha dalšími věcmi. Mobilní pomocník byl vyvinut ve Fraunhofer Institute for Production Engineering and Automation (IPA) a nyní jej do sériové výroby uvádí firma United Robotics Groups.

Návštěvníci veletřhu a této speciální výstavy si také vyzkouší výhody digitalizovaného skladování, včetně online údržby skladu a automatického tisku etiket. To vše zvyšuje nejen efektivitu v laboratoři, ale také bezpečnost práce, protože nesprávně nebo nedostatečně označená činidla a nevhodně skladované nebezpečné látky jsou již minulostí.

Umělá inteligence jako hnací síla.

Skutečnost, že si umělá inteligence stále více nachází cestu do světa laboratoří, se ukáže zvláště na konferenci analytica, která je vědeckým vrcholem veletřhu. Průkopníkem je lékařská diagnostika, která využívá umělou inteligenci například v diagnostice nádorů. Tomuto tématu bude věnována konference „Aplikace algoritmů umělé inteligence v laboratorní medicíně“ 10. dubna odpoledne. Využití umělé inteligence je užitečné nejen v medicíně, ale také v zobrazování a spektroskopii obecně, jak ukáže závěrečná přednáška celodenního symposia „A Dream Comes True: Fantastic News from Analytical Chemistry“ dne 9. dubna.

Uplatněte voucher na vstupenku zdarma s tímto kódem: analyticaAV63 na

<https://analytica.de/en/munich/tickets/>

Bližší informace k veletřhu: www.analytica.de

nabízí pro akademický rok 2024/2025

DOKTORSKÉ STUDIJNÍ PROGRAMY

(standardní doba studia 4 roky)

- Analytická chemie
- Anorganická chemie
- Anorganická technologie
- Biochemie
- Ekonomika a management podniků s procesními výrobami
- Fyzikální chemie
- Chemické a procesní inženýrství, specializace Environmentální inženýrství; Chemické inženýrství
- Chemie a technologie anorganických materiálů
- Inženýrství energetických materiálů
- Organická chemie
- Organická technologie
- Povrchové inženýrství

Všechny nabízené doktorské studijní programy je možné studovat v prezenční i kombinované formě. Přihlášky k doktorskému studijnímu programu musí být doloženy písemným souhlasem potencionálního školitele s návrhem tématu disertační práce, životopisem, potvrzením o zdravotní způsobilosti, doklady o dosaženém vzdělání.

Přihlášku lze podat buď elektronicky na adrese <http://eprihlaska.upce.cz> nebo na standardním formuláři „Přihláška ke studiu na vysoké škole v ČR“.

Termín přihlášek: 31. května 2024

OBSAH**ÚVODNÍK**

- Pražská makromolekulární setkání** 129
J. Podešva

REFERÁTY

- Vývoj a použití bioortogonálních reakcí pro zobrazování a aktivaci léčiv** 130
M. Vrábel a V. Šlachtová
- Tau protein v biologických tekutinách a jeho klinický význam** 138
L. Fialová, L. Nosková a T. Zima
- Identifikace buněčných cílů aktivních látek pomocí mikroskopických metod a fluorescenčních sond** 146
J. Stanková, M. Hajdúch a P. Džubák

PŮVODNÍ A METODICKÉ PRÁCE

- Testování vlivu potravinářských látek na izolaci DNA z makrelly obecné a rybích produktů** 154
E. Čermáková, K. Kodešová, P. Horká, K. Demnerová a K. Zdeňková

VÝUKA CHEMIE

- Integrace branné výchovy do výuky (nejen) chemie: radioaktivita a jaderné zbraně** 164
P. Teplý, S. Janoušková a P. Distler

- Významná databáze nebezpečných látek Medis-Alarm v České republice** 169
O. J. Mika, L. Polívka, K. Malinovský a T. Matýs

CONTENTS**EDITORIAL**

- Prague Meetings on Macromolecules** 129
J. Podešva

REVIEW ARTICLES

- Development and Application of Bioorthogonal Reactions for Drug Imaging and Activation** 130
M. Vrábel and V. Šlachtová
- Tau Protein in Biological Fluids and Its Clinical Value** 138
L. Fialová, L. Nosková, and T. Zima
- Identification of Cellular Targets of Active Substances Using Microscopic Methods and Fluorescent Probes** 146
J. Stanková, M. Hajdúch, and P. Džubák

ORIGINAL AND METHODOLOGICAL PAPERS

- Testing of the Effect of Food Additives on the DNA Isolation from Mackerel and Fish Products** 154
E. Čermáková, K. Kodešová, P. Horká, K. Demnerová, and K. Zdeňková

EDUCATION IN CHEMISTRY

- Integration of Military Education into the Teaching of (not only) Chemistry: Radioactivity and Nuclear Weapons** 164
P. Teplý, S. Janoušková, and P. Distler
- Medis-Alarm Significant Database of Hazardous Substances in Czech Republic** 169
O. J. Mika, L. Polívka, K. Malinovský, and T. Matýs

11. mezinárodní chemicko-technologická konference

DEKARBONIZACE ENERGETICKY NÁROČNÝCH ODVĚTVÍ - GREEN DEAL,

- Dekarbonizace - konverze a skladování energií, zachytávání uhlíku a jeho použití
- Inovativní způsoby výroby vodíku s využitím obnovitelných a udržitelných zdrojů energie
- Oběhové hospodářství

ORGANICKÁ TECHNOLOGIE, PETROCHEMIE, APLIKOVANÁ KATALÝZA A ORGANICKÁ TECHNOLOGIE

- Ropa, plyn, uhlí - alternativní suroviny, nové technologie, biorafinerie, paliva, biopaliva
- Petrochemie a organická technologie - alternativní suroviny, nové technologie, nové a rozhodující produkty včetně výroby polymerů
- Aplikovaná katalýza a organická technologie

BIOTECHNOLOGIE, TECHNOLOGIE CHEMICKÝCH SPECIALIT

- Biotechnologie a biorafinace
- Syntéza a výroba léčiv
- Polymery, kompozity

NOVÉ MATERIÁLY, ZDROJE ENERGIE, VODÍKOVÁ STRATEGIE, POKROČILÉ PROCESY A APARÁTY, TECHNOLOGIE PRO OCHRANU PROSTŘEDÍ

- Anorganická technologie
- Materiálové inženýrství (včetně moderních kovových biomateriálů pro lékařské účely)
- Procesní inženýrství
- Technologie pro ochranu prostředí

EKONOMIKA CHEMICKÉHO PRŮMYSLU

- Ekonomika chemického průmyslu v nových podmínkách

15.-17. 4. 2024
průběh
konference

do
11. 3. 2024
zaslání
abstrakt

do
25. 3. 2024
zlevněný
poplatek

do
30. 6. 2024
zaslání
plných
textů

Registrace, formulář k zaslání abstrakt
a další informace na www.icct.cz

SBORNÍK PLNÝCH TEXTŮ V ELEKTRONICKÉ FORMĚ

Nášim cílem je zveřejnit plné texty v angličtině v databázi Web of Science Clarivate Analytics. Plné texty budou po recenzi členy vědeckého výboru uveřejněny ve sborníku. Elektronický sborník (PDF) plných textů bude vydán v listopadu 2024 a umístěn na web konference.



CHEMICKÉ LISTY • ročník/volume 118 (2024), čís./no. 3 • LISTY CHEMICKÉ, roč./vol. 148, ČASOPIS PRO PRŮMYSL CHEMICKÝ, roč./vol. 134 • ISSN 0009-2770, ISSN 1213-7103 (e-verze) • evidenční číslo MK ČR E 321 • Vydává Česká společnost chemická jako časopis Asociace českých chemických společností ve spolupráci s VŠCHT Praha, s ČSPCH a ÚOCHB AV ČR za finanční podpory Rady vědeckých společností ČR, Akademie věd ČR, Nadace Český literární fond a kolektivních členů ČSCH • IČO 444715 • Published by the Czech Chemical Society • VEDOUČÍ REDAKTOR/EDITOR-IN-CHIEF: V. Vyskočil • REDAKTORI/EDITORS: J. Barek, E. Benešová, P. Drašar, P. Holý, P. Chuchvalec, M. Jurášek, Z. Kolská, B. Kratochvíl, J. Masák, J. Podešva, P. Šmejkal; Bulletin: P. Drašar; Webové stránky: R. Liboska, V. Vyskočil • ZAHRANIČNÍ A OBLASTNÍ REDAKTORI/FOREIGN AND REGIONAL EDITORS: F. Švec (USA, ČR) • TECHNICKÁ REDAKTORKA/EDITORIAL ASSISTANT: R. Řápková • REDAKČNÍ RADA/ADVISORY BOARD: K. Bláha, L. Červený, E. Dibuszová, L. Grubhoffer, J. Hanika, Z. Havlas, M. Hof, Z. Hostomský, J. Káš, M. Koman, P. Konvalinka, J. Kotek, J. Koubek, J. Málek, P. Matějka, K. Melzoch, V. Pačes, M. Pospíšil, V. Růžička, P. Slaviček, I. Stibor, J. Zima, T. Zima • ADRESA PRO ZASÍLÁNÍ PŘÍSPĚVKŮ/MANUSCRIPTS IN CZECH, SLOVAK OR ENGLISH CAN BE SENT TO: Chemické listy, Novotného Lávka 5, 116 68 Praha 1; tel./phone +420 221 082 370, e-mail: chem.listy@csvts.cz • INFORMACE O PŘEDPLATNÉM, OBJEDNÁVKY, PRODEJ JEDNOTLIVÝCH ČÍSEL A INZERCE/INFORMATION ADS: Sekretariát ČSCH, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; tel. +420 221 082 383, e-mail: chem.spol@csvts.cz, chem.ekonom@csvts.cz • PLNÁ VERZE NA INTERNETU/FULL VERSION ON URL: <http://www.chemicke-listy.cz> • TISK: TG TISK s.r.o., 5. května 1010, 563 01 Lanškroun • SAZBA, ZLOM: ČSCH, Chemické listy • Užití tohoto díla se řídí mezinárodní licencí Creative Commons Attribution License 4.0 • Cena výtisku 180 Kč, roční plné předplatné 2024 (12 čísel) 1810 Kč, individuální členské předplatné pro členy ČSCH 900 Kč. Roční předplatné ve Slovenské republice 96 EUR (doručování via SCHS), individuální členské předplatné pro členy ČSCH 73 EUR (doručování via SCHS), 96 EUR + poštovné (individuální doručování), ceny jsou uvedeny včetně DPH • DISTRIBUTION ABROAD: KUBON & SAGNER, POB 34 01 08, D-80328 Munich, FRG • Pokyny pro autory najdete na <http://www.chemicke-listy.cz>, zkratky časopisů podle Chemical Abstract Service Source Index (viz <http://cassi.cas.org/search.jsp>) • Chemické listy obsahující Bulletin jsou zaslány zdarma všem individuálním a kolektivním členům ČSCH a ČSPCH v ČR i zahraničí, do všech relevantních knihoven v ČR a významným představitelům české chemie a chemického průmyslu; v rámci dohod o spolupráci i členům dalších odborných společností • Molekulární námět na obálce (světle aktivovaný komplex ruthenia vázaný na DNA kvadruplex, McQuaid K. T. a spol.; <https://www.rcsb.org/structure/5ls8>): M. Štětina • Dáno do tisku 28.2.2024.

Excellence in Chemistry Research



Why publish with *ChemistryEurope*?

- Gold Open Access
- Publishing charges waived
- Preprints welcome
- Rigorous peer-review

Meet the Editors



Luisa De Cola

Università degli Studi
di Milano Statale, Italy



Lars Christian Grabow

University of
Houston, USA



Ken Tanaka

Tokyo Institute of
Technology, Japan

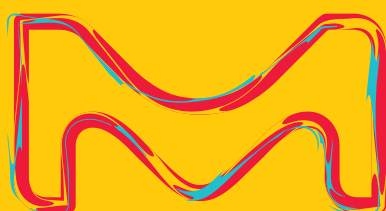
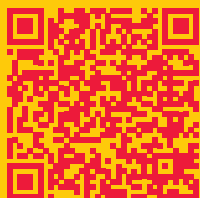
MERCK

chemists for chemists

Pioneering Innovation: From Our Lab to Yours

Collaborate with us to navigate the challenges of modern organic synthesis; our commitment to quality, timely delivery, and mutual success ensures that together, we advance science. Explore our extensive selection of core chemical products, as well as sustainable alternatives, cutting-edge technologies, and digital solutions. These offerings are specifically designed to guide you through the intricacies of drug discovery but also beyond, catalyzing your breakthrough discoveries and making organic chemistry more accessible and impactful for everybody.

Explore more:
[SigmaAldrich.com](https://www.sigmaaldrich.com)



The Life Science
business of Merck
operates as
MilliporeSigma in
the U.S. and Canada.

Sigma-Aldrich[®]
Lab & Production Materials