

Bio

Ročník 33 • Číslo 3/2023

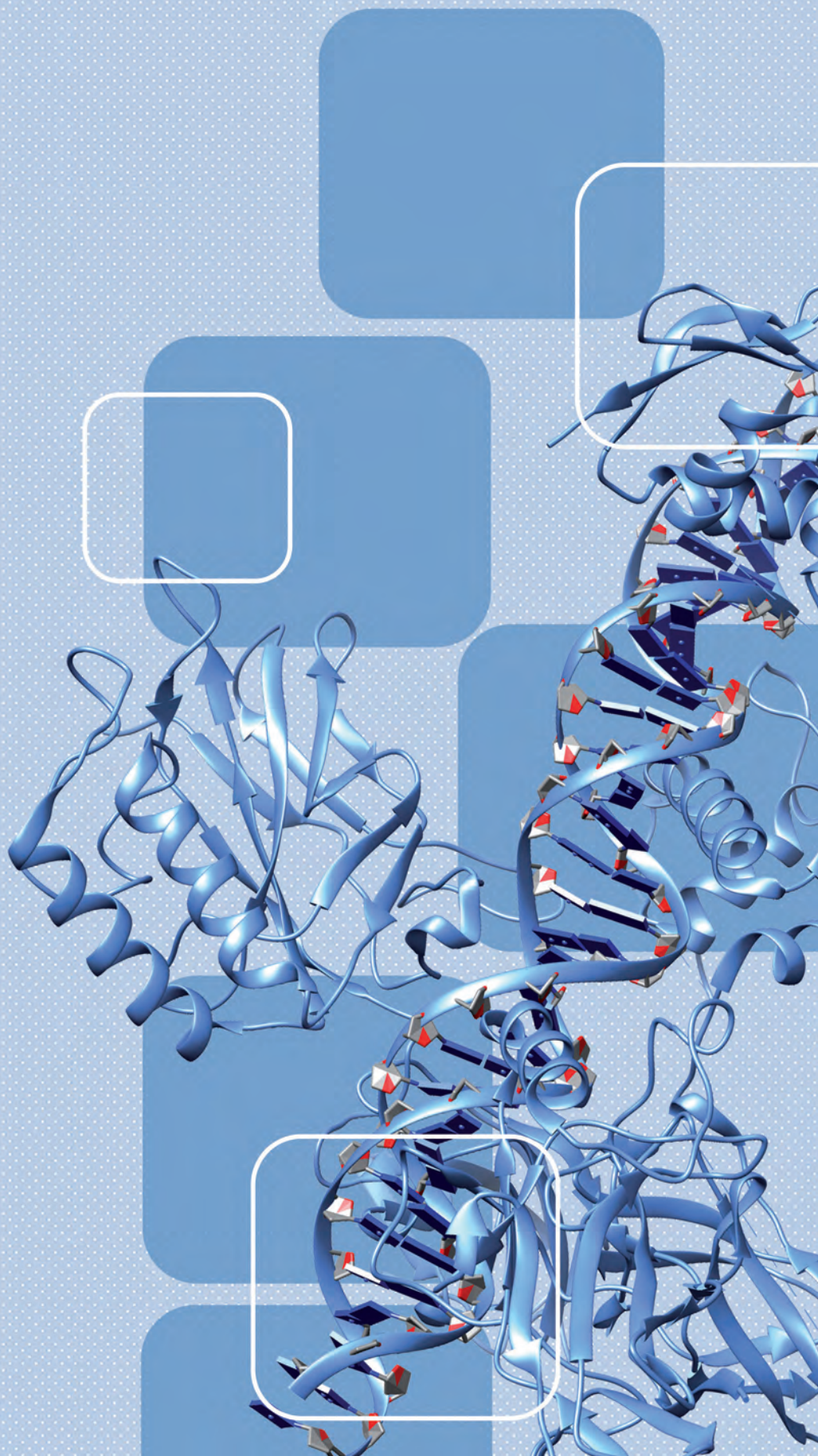
prospect

**BULLETIN
BIOTECHNOLOGICKÉ
SPOLEČNOSTI**

zakládajícího člena
Českého svazu
vědeckotechnických
společností (ČSVTS)

a

člena „European
Federation
of Biotechnology“
(EFB)



Bio prospect

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

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

BULLETIN OF CZECH BIOTECHNOLOGY SOCIETY

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

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

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

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

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

For more information contacts the editorial board or directly:

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

ÚVODEM

Vážení přátelé,

přinášíme Vám třetí letošní číslo našeho Bioprospectu. Jak jsme Vás již v minulém čísle podrobně informovali, naše střešní organizace připravuje pro letošní podzim (11. – 13. října 2023) významnou mezinárodní událost „7th World Engineering Convention“, na jejímž programu je 14 významných a velice aktuálních tematických okruhů. Zde bychom chtěli připomenout, že jedním z těchto klíčových programů je téma „Women in Science and Engineering“, které bude předsedat Livia Simon Sarkadi, profesorka maďarské univerzity a specialista na výživu (na webu je možné si poslechnout její program kongresové sekce). K účasti na tomto významném mezinárodním kongresu se stále ještě můžete přihlásit a využít slevy registračního poplatku, pokud jste členy naší společnosti.

Rádi bychom Vás dále upozornili na publikaci ISA-AA, nazvanou „Points to Ponder on Gene Editing: Can We Edit the Future of Food? V této publikaci diskutuje skupina expertů z různých částí světa možnosti využití těchto technik k hodnocení bezpečnosti potravin. Odhaduje se, že kolem r. 2050 dosáhne počet obyvatel zeměkoule 10 miliard a potřeba potravin se zvýší o 50 %. Vzhledem k očekávaným změnám klimatu bude obtížné tolik potravin vyprodukovat. Autoři publikace se domnívají, že „gene editing“ (změny DNA rostlin a živočichů) mohou vytvořit sklizně s vyšší produktivitou, rezistentní vůči škůdcům a chorobám tak, aby respektovaly měnící se klima a zajistily dostatek potravin pro rostoucí populaci.

Na VŠCHT se konala řada zajímavých přednášek a jiných aktivit. Uvádíme ty nejatraktivnější:

Seminář **Vesmírné biotechnologie** pořádaný společkem Biotrin, z.s. ve spolupráci s VŠCHT. Jak sám název naznačuje, cílem konference bylo seznámit účastníky s potenciálem kosmického šlechtění především pro řešení i prevenci dopadů potravinového nedostatku a kli-

matických změn. Byly představeny projekty v oblasti kosmického výzkumu v ČR i v zahraničí.

Hlavními přednášejícími byli:

Dr. Chris Dardick
(USDA-ARS; ARS Scientists Develop Ever-Flowering Fruit To Feed Astronauts;
Terrestrial fungus may be key to farming in space),
doc. Eduard Kejnovský
(PřF MUNI),
prof. Zdeněk Opatrný
(PřF UK; Kosmické šlechtění – naděje,
nebo podfuk?)
Dr. Ivan Kulich (PřF UK).

Národní centrum kompetence biorafinace a cirkulární ekonomiky pro udržitelnost

Podrobnosti o tomto významném projektu koordinovaném prof. Ing. Karlem Melzochem, CSc. lze rovněž najít na webových stránkách FPBT.

Při prohlížení webových stránek VŠCHT se nezapomeňte podívat na stránky klubu absolventů:

Alumni Klub VŠCHT Praha:

Technická 5
166 28 Praha 6 – Dejvice
Tajemník: Bára Uhlíková, DiS.
E-mail: bara.uhlikova@vscht.cz
Telefon: +420 220 444 443

Těšíme se na Vaše příspěvky a spolupráci v další činnosti naší Biotechnologické společnosti.

Přejeme Vám všem pevné zdraví a splnění Vašich přání v následujícím období

Za redakci Bioprospectu
Vaši
Jan Káš a Petra Lipovová

SOUČASNÉ TRENDY V CEREÁLNÍ TECHNOLOGII

Pavel Skřivan, Marcela Sluková

Ústav sacharidů a cereálií, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze; marcela.slukova@vscht.cz

Moderní biotechnologické postupy se v posledních desetiletích uplatňují i v natolik tradičním oboru, jakým je cereální technologie. Výroba chleba stojí do značné míry na fermentačních procesech již od pradávna a stejně tak i další významné biochemické děje primárního a sekundárního zpracování obilovin, které tam pronikly již v dávných dobách. To podstatné, co charakterizuje vývoj v posledních desetiletích a promítá se do naší technologie stále významněji, je znalost podstaty mikrobiologických, biochemických a fyzikálně chemických procesů, které se zde uplatňují, a schopnost je směřovat a řídit. Cereální technologie se v poslední době velmi často vrací k postupům, které již upadaly či upadly v zapomnění, stejně jako k surovinám – obilovinám, pseudoobilovinám, luštěninám i dalším plodinám, které se historicky využívaly pro výrobu chleba, pečiva i dalších cereálních produktů, a globalizuje se v tom smyslu, že se rozšiřuje spektrum plodin i postupů o takové, které mívaly pouze lokální význam. K technologickým postupům uplatňovaným v historii se však navracíme na nové úrovni jejich poznání a chápání a snažíme se v maximální míře využít jejich potenciál. Totéž ve stejném duchu platí i o surovinách.

Hovoříme-li o potenciálu zrna/nažky/semena, pak máme na mysli především potenciál výživový, tj. maximálně efektivní využití těch složek našich surovin, které představují nebo mohou představovat nutriční přínos. Obiloviny sloužily po tisíciletí především jako zdroj dostupné energie uložené v molekulách škrobu a jako významný zdroj proteinů (byť neplnohodnotných). V současné době však ve vyspělých částech světa řešíme (poprvé v lidské historii) problém přebytku energie v sortimentu potravin dostupném naprosté většině populace. Přebytková energetická bilance je dána nejen bohatnutím společnosti, ale zejména také radikální změnou životního stylu, který vedl k podstatně menší energetické náročnosti naší každodenní činnosti. Klesla potřeba fyzické práce a pohybu vůbec. Z toho důvodu se historická přednost obilovin stala diskutabilní, a proto v nich hledáme (a často také nacházíme) další nutričně významné benefity a jejich energetickou vydatnost se naopak snažíme redukovat. Proto také návrat k zapomenutým plodinám a rozšiřování sortimentu surovin. Hlavní chlebová obilovina – pšenice – která postupně ovládla i ty části světa, kde se využívala pouze okrajově, s sebou sice přinesla oblíbené typy produktů (chleba, pečiva, těstovin), které mají jedinečné a jen velmi těžko napodobitelné sensorické vlastnosti, ale představují právě především energeticky bohaté potraviny navíc s vysokým glykemickým indexem.

Základní cíle, které z dnešního pohledu v dalším rozvoji cereální technologie vidíme, jsou:

1. Zvýšení rozmanitosti produktů tradičního typu (chleba, pečiva, těstovin) i dalších cereálních výrobků včetně netradičních.
2. Zvýšení podílu vlákniny a případně také proteinů oproti škrobu a snížení glykemického indexu cereálních výrobků.

3. Další rozšíření sortimentu bezlepkových cereálních produktů v rámci speciální výživy pro osoby trpící celiakií či jinou formou intolerance lepku.
4. Zefektivnění využití přirozeného nutričního potenciálu zpracovávaných plodin (uchování maxima přínosných biologicky aktivních látek, zvýšení jejich biologické dostupnosti a využitelnosti).
5. Řízené modifikace nutriční hodnoty cereálních výrobků snížením obsahu nežádoucích složek a zvýšením obsahu nutričně přínosných složek.
6. Zvýšení sensorické atraktivity cereálních produktů s vysokým obsahem vlákniny.

V praxi to znamená zejména vývoj moderních typů dezintegrace (mletí) obilovin, pseudoobilovin, luštěnin a dalších plodin, které povedou k žádoucímu zjemnění granulace částic obalových a podobalových vrstev zrna bohatých na vlákninu a doprovodné biologicky aktivní látky. Toho je ovšem třeba dosahovat při maximální šetrnosti k ostatním složkám.

Enzymové procesy se uplatňují zejména během postupů takzvané hydrotermické úpravy zrn, šrotů nebo mouk. Aby byl jejich průběh dostatečně účinný, musejí být správně nastaveny tři základní parametry – vlhkost, teplota a čas. Historicky se vyvinula celá škála takových postupů založených na čistě empirické bázi. Dnes již známe podrobně podstatu těchto změn. Ve vodním prostředí (např. při nakrápění nebo máčení obilného zrna) dochází k sorpci a navázání vody do struktury biopolymerů, tj. škrobu (rychlejší sorpce vody probíhá v případě škrobu poškozeného zejména během dezintegrace), složek rozpustné (bobtnavé) vlákniny a proteinů. Dochází k aktivaci enzymů a k jejich hydrolytickému působení (štěpení škrobu, degradaci proteinů i částečné hydrolyze některých složek vlákniny). Všechny tyto děje probíhají rychleji a intenzivněji při vyšší teplotě, a to včetně enzymové hydrolyzy. Amylasy a do jisté míry i proteasy jsou relativně termostabilní a jejich teplotní optima jsou vysoká. Spolupůsobení vlhkosti a teploty v čase nazýváme souhrnně hydrotermickou úpravou. Zrno je možné podrobit hydrotermické úpravě vcelku, nebo po (částečné) dezintegraci, tj. v podobě loupáné (či jinak povrchově opracované), vloček, krup, lámanek, trhanek, šrotů, stejně jako krupic a mouk.

Řízené postupy hydrotermické úpravy, máčení a klíčení obilných zrn a jejich částí vedou ke změně obsahu a struktury oligosacharidů, škrobu a neškrobových polysacharidů. Vedle biochemických procesů (aktivace a působení enzymů, tvorba nízkomolekulárních fermentovatelných látek a jejich zapojení do dalších reakcí, uvolnění substrátů pro vznik sensoricky významných látek, vznik exopolysacharidů a oligosacharidů) hrají roli i fyzikální projevy (hydratace, bobtnání a mazování, tvorba nízkomolekulárních ve vodě rozpustných látek). Produkty enzymové hydrolyzy polysacharidů jsou v konečné fázi jednoduché cukry (maltosa, glukosa a další), jejichž přítomnost se projevuje nasládlou chutí produktů. Reakce neenzymového hnědnutí vedou k produktům přispívajícím charakteristickou mírně nahořklou chutí a zejména širokým spektrem vonných látek.

Vedle významných modifikací fyzikálně-chemických a sensorických (organoleptických) vlastností dochází také v procesech hydrotermické úpravy k významným změnám nutričních vlastností zpracovávané suroviny. Vlivem bobtnání a částečné hydrolýzy dochází k rozvolnění struktur obalových a podobalových vrstev zrna a tím k uvolnění složek vlákniny a doprovodných látek s často významnou biologickou aktivitou. Správně vedený proces hydrotermické úpravy má tak za následek zvýšení biologické dostupnosti těchto látek a přispívá tak ke zvýšení nutriční hodnoty produktu.

Příkladem stále častěji používaných typů hydrotermické úpravy jsou příprava zápary či závařky, které jsou sice tradičními postupy, nicméně v současné době prováděnými nikoli na základě empirických poznatků, jak tomu bylo dříve, ale na základě současných znalostí jejich fyzikálně-chemické, biochemické a mikrobiologické podstaty. V dnešní době se tyto procesy vedené řízeným způsobem na speciálních zařízeních také označují jako aromatechnologie. Při kontrolovaném máčení obilných zrn ve vodě o teplotě 20 – 30 °C po dobu 12 – 24 h difunduje voda mikropóry dovnitř zrna a tím je zahájen proces bobtnání škrobu a proteinů. Vláknina, enzymy a bioaktivní látky zůstávají v této fázi beze změny. Intenzivním ohřevem zrna ve vodě po dobu několika hodin se získá produkt označovaný jako zápara (ohřev při teplotě cca 50 °C) nebo závařka (ohřev při teplotě nad 60 °C).

V případě zápary je po smíchání vody a většinou celých zrn směs zahřívána na teplotu kolem 50 °C a poté ponechána cca 2 – 3 h stát. Díky vyšší teplotě v porovnání s máčením dochází k rychlejšímu pohybu a příjmu vody do struktury zrna a ke zvětšení objemu zrna. Při zahřívání a během stání směsi dochází k intenzivnímu bobtnání škrobu (nastává rozpad škrobových zrn) a bobtnání proteinů, k částečnému bobtnání složek rozpustné vlákniny, nepatrnému výluhu vitamínů (vitaminů skupiny B) a rozpustných solí minerálních látek.

Při přípravě závařky se jedná o smíchání vody a zrn (nebo šrotu či jemnějších produktů – mouk), zahřátí směsi na teplotu 60 – 65 °C (i výše) po dobu několika hodin. Produkt pak chladne a dozrává. Většinou jsou do směsi přidávány i amylolytické enzymy, nejčastěji ve formě enzymově aktivní sladové mouky. Nastává intenzivní enzymové odbourávání zmazovatělého škrobu na dextriny nebo až na cukry (maltosa, glukosa). Jednoduché sacharidy způsobují nasládlou chuť produktu a během tepelné úpravy se podílí na barvě kůrky a vůni a chuti pekařského výrobku se závařkou. Vedle aktivace původních amylolytických enzymů jsou aktivovány i proteolytické enzymy. Probíhá hydrolýza proteinů za vzniku různých peptidů a aminokyselin, které mohou přispívat k profilu aromatických látek závařky a finálního pekařského produktu. Aminokyseliny se navíc při procesu pečení spolu s cukry zapojují do reakcí neenzymového hnědnutí (Maillardova reakce, vybarvení kůrky pečiva a charakteristické vonné a chuťové látky pečiva). S delší dobou stání směsi dochází k intenzivnějšímu bobtnání části rozpustné vlákniny a k výluhu některých nízkomolekulárních, ve vodě rozpustných látek. Po sensorické stránce jsou obilná zrna ve formě závařky snadnou žvýkatelná, s měkkou konzistencí a velmi příjemnou vůní a chutí. Delší doba a vyšší teplota úpravy zrna vede ke zvýšení využitelnosti některých bioaktivních látek.

Fermentační procesy provázejí zpracování obilovin od jeho počátků v dávné historii. Základními procesy, které se v cereální technologii uplatňují, jsou etanolové a mléčné kvašení. Zatímco první z nich se využívá především díky tvorbě oxidu uhličitého (kvasného plynu) sloužícího k nakypření těsta, mléčné kvašení jak homo- tak heterofermentativního typu má zásadní vliv na sensorické vlastnosti výrobku. Ale jak se ukázalo, také na výživové vlastnosti, a to jak tvorbou některých nutričně významných a biologicky aktivních látek (například exopolysacharidů), tak také zvýšením biologické dostupnosti a využitelnosti látek přítomných v zrnech a primárních produktech. Hlavní produkty mléčného kvašení, především sama kyselina mléčná, slouží také díky své antifungální aktivitě jako přirozený konzervant a stabilizátor výrobků. Příprava (výroba) kvasů a jejich aplikace při výrobě chleba a pečiva je součástí a v jistém smyslu i fundamentem sekundárního zpracování obilovin již od jeho počátků. Kvasy se připravovaly především z primárních produktů (šrotů a mouk) základních chlebových obilovin (pšenice, ječmene a posléze žita) a jejich nositelem byly jak etanolové tak mléčné kvašení. Žitné kvasy, v nichž se kombinují oba typy kvašení, jsou typické pro střední, severní a východní Evropu.

Kvasy se obecně připravují buďto spontánní iniciací z přirozené mikroflóry obilovin, nebo pomocí startovacích kultur rozmanitého složení. Vedou se v jednom nebo více stupních a některé z nich jsou opakovatelné, čili větší část finálního kvasu se používá pro tvorbu těsta a menší část se vrací jako základ pro další kvasný cyklus. V současné době však existuje mnoho technologických postupů výroby vitálních (živých) kvasů, které využívají moderní poznatky mikrobiologie, biochemie a nauk o výživě, a které představují skutečně zpracované biotechnologické procesy. Z důvodů uvedených výše se kvasům věnuje v moderní cereální technologii značná pozornost a vyvíjejí se postupy modifikace a optimalizace fermentačních procesů s ohledem na kvantitativní i kvalitativní skladbu produktů, zejména na obsah a zvýšení dostupnosti biologicky aktivních a nutričně přínosných látek. Kvasy také díky své stabilizační schopnosti snižují nebo eliminují potřebu přísad některých přídatných látek sloužících k prodloužení čerstvosti a trvanlivosti chleba a pečiva. Jako substrát slouží primární produkty žita i pšenice, ale v poslední době se pozornost stále více zaměřuje také na méně tradiční obiloviny (např. čirok), ale také na pseudoobiloviny i luštěniny.

Již v blízké budoucnosti můžeme očekávat, že se možnosti regulace enzymových a fermentačních procesů přestanou omezovat pouze na metody, které se v praktické cereální technologii uplatňují dosud zcela převážně, totiž na úpravy fyzikálních a fyzikálně-chemických podmínek, za nichž tyto procesy probíhají, nebo na přísady enzymů či inokulací mikroorganismy. Používat se začnou hlubší a sofistikovanější zásahy do jejich molekulárně biologické podstaty. Takové zásahy, které povedou k účinnějšímu ovlivnění složení cereálních produktů, ať již ve smyslu obohacení o biologicky aktivní látky, nebo naopak eliminace některých nežádoucích složek (např. lepku) jsou již předmětem výzkumu a jejich aplikace je pouze otázkou času.

PERSPEKTIVY DERIVÁTŮ INZULINU S PREFERENČNÍM PŮSOBENÍM V JÁTRECH

Jiří Jiráček a Lenka Žáková

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo nám. 2, 16610 Praha 6; jiri.jiracek@uochb.cas.cz

Úvod

Diabetes mellitus, neboli cukrovka, je vážné metabolické onemocnění způsobené buď neschopností slinivky břišní produkovat peptidový hormon inzulin (diabetes prvního typu) nebo ztráty schopnosti organismu na inzulin správně reagovat (diabetes druhého typu)^{1,2}. Diabetes prvního typu je způsoben autoimunní destrukcí buněk slinivky produkujících inzulin a doprovází lidstvo od nepaměti. Tento typ diabetu je prozatím neléčitelný, ale podáním exogenního inzulinu lze eliminovat projevy diabetu, tzn. neschopnost těla pojmout glukózu z krve do buněk a metabolizovat ji, a tak umožnit diabetikům vést víceméně plnohodnotný život. V roce 2022 uplynulo již sto let od prvního úspěšného podání inzulinu diabetickému pacientovi. Naproti většina diabetiků (přes 90 %) ovšem trpí diabetem druhého typu, kdy tělo produkuje inzulin víceméně bez problémů, ale ztrácí schopnost na něj citlivě reagovat. Molekulární mechanismus vzniku diabetu druhého typu je stále nejasný, jedná se o onemocnění způsobené dysfunkcí více genů a diabetes druhého typu je takřka vždy doprovázen obezitou. Diabetes druhého typu je tedy onemocnění způsobené nezdravým způsobem života, nedostatkem pohybu a nadměrným příjmem vysokokalorické potravy. Kvůli rostoucímu počtu diabetiků a obézních lidí v populaci je situace v současnosti přirovnávána k epidemii. V České republice více než jeden milión občanů trpících diabetem³. Diabetes druhého typu lze léčit v počáteční fázi dietou a zvýšeným pohybem, později orálními antidiabetiky, jako je například metformin. U řady diabetiků druhého typu ovšem v pozdější fázi onemocnění dochází k sebepoškozování slinivky, neboť ta se snaží kompenzovat nízkou citlivost organismu na produkovaný inzulin jeho stále vysokou produkcí a sekrecí. To může nakonec vést ke ztrátě schopnosti produkce vlastního inzulinu a v důsledku nakonec k nutnosti aplikovat denně inzulin stejně jako u diabetu prvního typu.

Společným projevem obou typů diabetu je vysoká hladina cukru v krvi a neschopnost jej efektivně metabolizovat. Chronicky dlouho trvající zvýšená hladina cukru v krvi má pro organismus fatální důsledky, neboť pozvolna dochází ke kovalentní modifikaci proteinů ve stěnách krevních cév molekulou glukosy a k jejich následnému poškození. V důsledku toho diabetičtí pacienti trpí řadou cévních a nervových onemocnění, které mohou vést ke ztrátě funkčnosti orgánů či končetin, nižšímu komfortu života a k předčasným úmrtím. Hlavním cílem léčby u diabetiků je tedy udržet hladinu krevní glukózy ve fyziologickém rozmezí, tzn. přibližně 3,9 – 5,6 mmol/l.

Fyziologická produkce inzulinu pankreatickými β -buňkami a jeho sekrece do krevního řečiště je nesmírně

efektivní a precizně regulovaný proces, kdy pankreas citlivě, v rozmezí několika málo minut, reaguje sekrecí inzulinu na vyšší či nízkou hladinu glukosy v krvi a kdy koncentrace inzulinu v krvi neklesá obvykle pod přibližně 50 pmol/l na lačno a nepřevyšuje 250 pmol/l po jídle. Příliš mnoho inzulinu v krvi by totiž mohlo přivést organismus do stavu hypoglykémie, tzn. příliš nízké hladiny krevní glukosy, což by pro organismus mohlo být fatální v důsledku poškození mozku, který nepřetržitě spotřebovává značné množství glukosy. Říkáme tedy, že inzulin má velmi úzký terapeutický index, což znamená, že je organismu prospěšný jen v úzkém koncentračním rozmezí, mimo které inzulin škodí⁴.

Při fyziologickém působení je inzulin ze slinivky nejprve vylučován portální žílou do jater, kde inzulin zastaví produkci jaterní glukosy inhibicí glukoneogeneze a glykogenolýzy⁵. Odhaduje se, že játra metabolizují asi polovinu inzulinu přicházejícího ze slinivky. Zbýlý inzulin se poté dostává do cirkulace a periférie organismu, zejména do svalové a tukové tkáně, kde umožní vstup glukosy do buněk aktivací receptoru inzulinu a následně glukosového transportéru GLUT4. Při podkožním podání exogenního inzulinu diabetikům se inzulin z místa vpichu uvolňuje hlavně nejprve do tukové a svalové tkáně a jeho působení v játrech zpožděno. V důsledku toho dochází k opožděnému utlumení endogenní produkce glukosy a tím k nerovnováhám v regulaci hladiny krevního cukru, což dlouhodobě vede ke zdravotním problémům.

Z těchto důvodů byla vynaloženo značné úsilí pozměnit molekulu inzulinu tak, aby putovala do jater po podkožním podání rychleji než inzulin lidský či jeho klinicky používané analogy.

Hepatosелеktivní inzulin peglispro

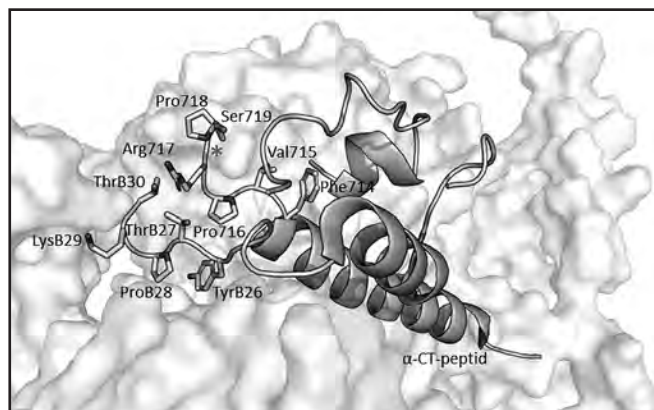
V tomto kontextu, firma Eli Lilly vyvinula derivát inzulinu nazvaný peglispro (LY2605541 či BIL), který obsahuje kovalentně připojený lineární 20 kDa polyetylen glykolový (PEG) řetězec k postrannímu řetězci LysB28 (derivát peglispro ještě obsahuje oproti lidskému inzulinu záměnu aminokyselin ProB28-LysB29 za LysB28-ProB29)⁴. Prodlouženého účinku je dosaženo díky zvětšené hydrodynamické velikosti analogu díky konjugátu s PEG, který je více než čtyřikrát větší než nemodifikovaný inzulin. Toto zvětšení velikosti má za následek pomalejší podkožní absorpci a také podstatně sníženou glomerulární filtraci, což obojí přispívá k výraznému prodloužení poločasu života peptidu⁶. Klinické studie s inzulinem peglispro potvrdily farmakokinetiku s prodlouženým účinkem na snížení glukosy, který přetrvával až 36 hodin⁷. Z přímého srovnání inzulinu peglispro s inzulinem glarginem u pacientů

s diabetem prvního typu vyplynulo, že pacienti léčení inzulinem peglispro dosáhli lepší kontroly glykémie a použití peglispra bylo doprovázeno menším rizikem hypoglykémie, a dokonce snížením váhy u pacientů, což je u léčby inzulinem unikátní⁸. Jedinečnou vlastností inzulínu peglispro je jeho hepatoselektivní působení v klinických studiích provedených u psů i lidí, kdy subkutánní podání inzulínu peglispro vykazovalo preferenční jaterní účinek, což se projevilo posunem od spotřeby játry produkované glukózy k využití periferní glukózy⁹. Tato data naznačovala, že tento analog může po podkožním podání fungovat fyziologičtějším způsobem než lidský inzulin.

Další data z klinických studií ovšem ukázala, že použití peglispro, ve srovnání s inzulinem glarginem (analog inzulínu s prodlouženým účinkem), bylo doprovázeno vyššími hladinami jaterního tuku, triglyceridů a alanin aminotransferasy, avšak bez závažného poškození jater¹⁰. Nicméně kvůli těmto nepříznivým účinkům společnost Eli Lilly nejprve odložila žádost o schválení inzulínu peglispro jako léčiva, aby mohla dále vyhodnotit bezpečnost tohoto derivátu v pokračujících studiích fáze III, a nakonec v roce 2015 ukončila jeho vývoj⁴.

Izoformy receptoru pro inzulin

Inzulin vyvolává své fyziologické efekty vazbou na receptor pro inzulin a aktivací tohoto receptoru. Receptor pro inzulin je transmembránový glykoprotein o relativní molekulové hmotnosti více než 150 kDa. Je poměrně málo známým faktem, že receptor inzulínu existuje ve dvou izoformách, A (IR-A) a B (IR-B), které se liší pouze 12 aminokyselinami, které jsou v IR-B umístěny na C-konci α -podjednotky a které v IR-A receptoru chybí¹¹. Těchto rozdílových 12 aminokyselin receptoru



Obrázek 1. Interakce inzulínu s doménami L1, CR a α -CT izoformy A receptoru pro inzulin. Konec C domény α -CT IR-A je zobrazen ve světle modré barvě a ve formě kostry peptidového řetězce (částečně ve šroubovicové konformaci) a se zobrazenými postranními řetězci aminokyselin Phe714, Val715, Pro716, Arg717 a Pro718. Červená hvězdička označuje místo, kde je do α -CT vloženo 12 aminokyselin izoformy B receptoru. Přilehlé domény L1 a CR receptoru jsou znázorněny jako světle šedý povrch. Řetězce inzulínu jsou zobrazeny v okrové barvě a v inzulínu jsou označeny aminokyseliny TyrB26, ThrB27, ProB28, LysB29 a ThrB30. Obrázek byl připraven v programu PyMol na základě struktury PDB ID 6SOF.

je ovšem umístěno v blízkosti vazebného místa pro inzulin (Obrázek 1). Lidský inzulin má vůči oběma izoformám receptoru přibližně stejnou vazebnou afinitu¹². Důležitým faktem je, že obě izoformy mají rozdílné tkáňové zastoupení. Zatímco lidský mozek a lymfatické tkáně obsahují takřka výhradně IR-A, játra mají takřka výhradně IR-B a ostatní tkáně jako tuková nebo svalová obsahují různé poměry obou izoform¹³.

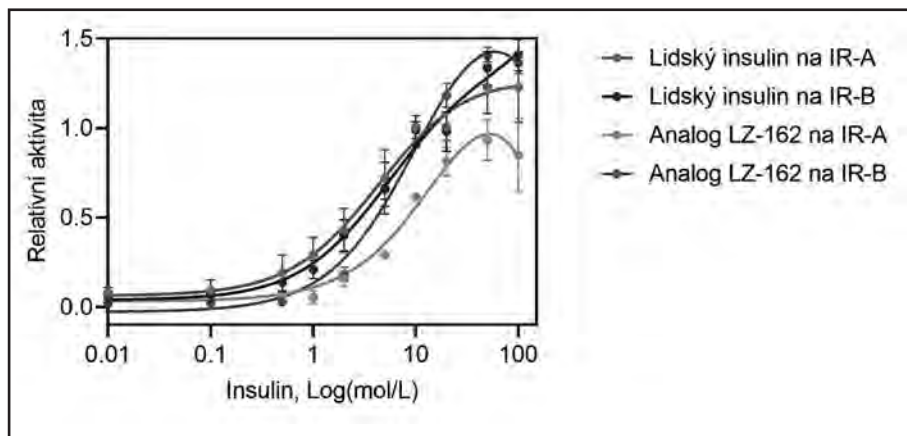
Tkáňové zastoupení obou izoform a zejména takřka výhradní zastoupení IR-B v játrech vedly k úvahám, zda by bylo možné lidský inzulin pozměnit tak, aby vykazoval vazebnou specifitu vůči IR-B, ideálně nižší vazebnou afinitu vůči IR-A a vyšší vůči IR-B, ve srovnání s lidským inzulínem.

Analogy inzulínu s pozměněnou vazebnou specifitou vůči izoformám receptoru pro inzulin

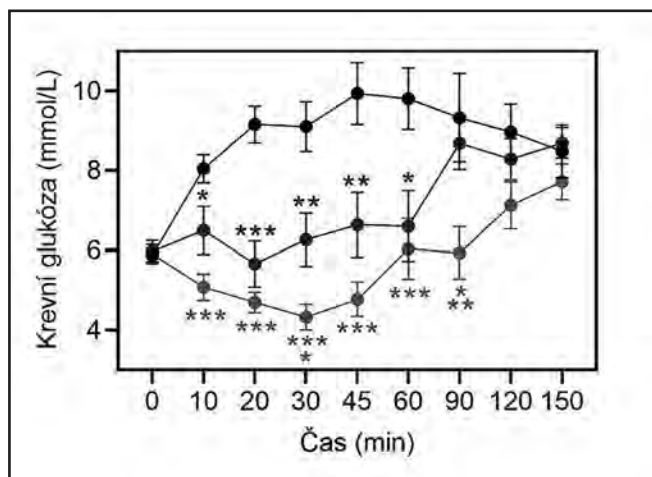
Výzkumníci z Novo Nordisk A/S vyvinuli analog inzulínu INZ-B ([HisA8, AsnB25, GluB27-desThrB30]-inzulin), který vykazuje 26 – 30 % vazebné afinity lidského inzulínu vůči IR-B a 8 – 10 % vůči IR-A. To znamená, že INZ-B asi 3x specifitější vůči IR-B než vůči IR-A. Podařilo se jim také vyvinout derivát inzulínu INZ-A, který vykazuje 55 % vazebné afinity lidského inzulínu vůči IR-A a 10 % vůči IR-B a jeho vazebná afinita je tedy asi 5,5x vyšší vůči IR-A než vůči IR-B. Tyto dva deriváty inzulínu s pozměněnou vazebnou specifitou byly použity pro studium jejich účinků v potkaních *in vivo*¹⁴. INZ-A byl více účinný ve stimulaci syntézy glykogenu ve svalu než v hepatocytech a také než při stimulaci lipogeneze v adipocytech. Naproti tomu INZ-B byl více účinný v hepatocytech než ve svalu a adipocytech. Tyto výsledky dobře reflektují tkáňové zastoupení izoformy IR-B (více v hepatocytech a méně ve svalu a adipocytech) a vazebnou selektivitu analogů. Výsledky této studie jsou důležité, protože dokládají, že i analogy inzulínu s relativně mírně (3 – 5x) pozměněnou vazebnou specifitou vůči izoformám IR mohou vyvolávat tkáňové selektivní fyziologické efekty, a napovídají, že tato strategie modifikace inzulínu by mohla být perspektivní pro vývoj nových léčiv diabetu. Firma Novo Nordisk A/S ovšem v tomto slibném výzkumu dále nepokračovala.

Před několika lety jsme se v naší laboratoři rozhodli v „oživit“ myšlenku analogů inzulínu se zvýšenou vazebnou selektivitou vůči IR-B¹². Využili jsme znalosti, jak se inzulin váže na IR-A. Ve struktuře inzulínu v komplexu s IR-A ovšem není 12 rozdílových aminokyselin receptoru přítomných a struktura komplexu s IR-B, ve kterém by tyto aminokyseliny byly vidět, se ještě vyřešit nepodařilo. Důvodem může být značná pohyblivost tohoto úseku.

Naši strategií bylo modifikovat ty aminokyseliny v inzulínu, které by mohly být případně v kontaktu s 12 rozdílovými aminokyselinami IR-B (Obrázek 1). Ze série asi 50 analogů inzulínu¹⁵, které jsme připravili a které byly systematicky testovány za účelem zjištění jejich vazebných afinit vůči IR-A a IR-B, analog [AlaB29, GluB31, amidB31]-inzulin (či LZ-162), s koncem C řetězce B prodlouženým o amid kyseliny glutamové, vykazoval více než trojnásobnou vazebnou selektivitu



Obrázek 2. Schopnost lidského inzulinu a analogu LZ-162 stimulovat autofosforylaci receptorů IR-A a IR-B.



Obrázek 3. Změny koncentrace krevní glukózy v myších (samci C57Bl/6n, 10 zvířat na skupinu) po aplikaci solného roztoku (černě), lidského inzulinu (modře) a analogu LZ-162 v dávce 4,5 nmol/kg aplikované po 5h hladovění. Výsledky jsou zobrazeny jako průměry deseti hodnot se směrodatnou odchylkou (SEM). *je pro $p < 0,05$, ** je pro $p < 0,01$, a *** je pro $p < 0,001$. Modré hvězdičky indikují, ve kterých hodnotách byl efekt lidského inzulinu statisticky významně rozdílný od efektu solného roztoku. Zelené hvězdičky indikují, ve kterých hodnotách byl efekt LZ-162 statisticky významně rozdílný od efektu solného roztoku a červené hvězdičky indikují, ve kterých hodnotách byl efekt LZ-162 statisticky významně rozdílný od efektu lidského inzulinu.

Literatura:

1. Brody H, Deweerdt S, Greenbaum S, et al.: *Nature* 485, S1 (2012).
2. Nature Milestones: Diabetes, <https://www.nature.com/collections/diabetes-milestones> (2021).
3. MZČR: <https://zdravi2030.mzcr.cz/zdravi-2030-analyticka-studie-stav-obyvatelsva.pdf>
4. Zaykov AN, Mayer JP, DiMarchi RD: *Nat Rev Drug Discov* 15, 425 (2016).
5. Herring R, Jones RH, Russell-Jones DL: *Diabetes Obes Metab* 16, 1 (2014).
6. Caparrotta TM, Evans M: *Diabetes Obes Metab* 16, 388 (2014).

vůči IR-B, přičemž jeho afinita k IR-B byla vyšší (140 %) a k IR-A nižší (44 %) než u inzulinu lidského (100 %). Dalším zajímavým poznatkem bylo, že analog LZ-162 vykazoval také asi 4 x vyšší odolnost vůči denaturaci při 37 °C než lidský inzulin. Odolnost preparátů inzulinu vůči denaturaci je důležitý faktor, neboť inzulin je dodáván pacientům v roztoku a ti jej často uchovávají bez možnosti chlazení. Usoudili jsme tedy, že derivát inzulinu LZ-162 by mohl být vhodným kandidátem pro další vývoj inzulinu s hepatoselektivním účinkem.

Dále jsme porovnali schopnost analogu LZ-162 a lidského inzulinu stimulovat autofosforylaci receptoru inzulinu ve fibroblastech produkujících pouze jednu z jeho izoform (Obrázek 2). Analog LZ-162 aktivuje IR-B v buňkách podobně jako inzulin lidský, ale jeho schopnost aktivovat IR-A byla znatelně nižší.

Tento výsledek nás povzbudil k testování schopnosti analogu LZ-162 snižovat hladinu krevní glukózy v myších *in vivo* a poněkud překvapivé bylo zjištění, že je analog při stejné dávce zdánlivě aktivnější než lidský inzulin (Obrázek 3). Je lákavé spekulovat, že vyšší aktivita LZ-162 v myších by mohla být způsobena jeho silnější a rychlejší aktivitou v játrech.

V současné době porovnáváme efekty LZ-162 a lidského inzulinu na aktivaci receptoru inzulinu v různých orgánech po aplikaci do myši. Doufáme, že se nám podaří prokázat selektivní účinek analogu na některé orgány. Pokud bude výsledek pozitivní, budeme uvažovat o rozsáhlejší a komplexnější studii účinků LZ-162 ve zvířatech. Cílem je prokázat, že koncept derivátů inzulinu s pozměněnou vazebnou afinitou vůči jednotlivým izoformám receptoru inzulinu je životaschopný a stojí za další vývoj.

Poděkování

Tato práce vznikla za podpory Národního inztitutu pro výzkum metabolických a kardiovaskulárních onemocnění (Program EXCELES, ID Projektu No. LX22NPO5104, financovaného Evropskou unií – Next Generation EU) za podpory Grantové agentury České republiky (projekt 23-05805S) a za podpory Akademie věd České republiky (výzkumný projekt RVO:6138963 pro Ústav organické chemie a biochemie).

7. Bergenstal RM, Rosenstock J, Bastyr EJ 3rd, et al.: *Diabetes Care* 37, 659 (2014).
8. Jacober SJ, Rosenstock J, Bergenstal RM, et al.: *Diabetes Obes Metab* 16, 351 (2014).
9. Henry RR, Mudaliar S, Ciaraldi TP, et al.: *Diabetes Care* 37, 2609 (2014).
10. Hartman ML: *Liver Enzyme Results from 7 Basal Insulin Peglispro (BIL) Clinical Trials in T1D and T2D*, http://app.core-apps.com/tristar_ada15/abstract/160858d53930b598d64b10f393d4a39e (2015).
11. Lawrence MC: *Mol Metab* 52, 101255 (2021).

Literatura (pokračování):

12. Jiráček J, Žáková L: *Front Endocrinol* 8, 167 (2017).
13. Moruzzi N, Lazzeri-Barcelo F, Valladolid-Acebes I, et al.: *J Cell Mol Med* 25, 4800 (2021).
14. Vienberg SG, Bouman SD, Sorensen H, et al.: *Biochem J* 440, 301 (2011).
15. Paníková T, Mitrová K, Halamová T, et al.: *J Med Chem* 64, 14848 (2021).

Souhrn

Jiráček J. et al.: Perspektivy derivátů inzulinu s preferenčním působením v játrech

Cukrovka je vážné metabolické onemocnění způsobené neschopností těla produkovat inzulin či na něj citlivě reagovat. Životy miliónů diabetických pacientů jsou zachraňovány díky pravidelné podkožní aplikaci inzulinu. Přes 100 let výzkumu inzulinu stále ještě není optimalizováno jeho podání pacientům, které se liší od fyziologického působení, kdy je inzulin sekretován ze slinivky nejprve do jater, kde plní důležité fyziologické funkce, a až pak do periferie organismu. Opožděné působení inzulinu v játrech po podkožním podání způsobuje nerovnováhy v glykémii pacientů a tím i zdravotní komplikace. V této práci shrnujeme výsledky dosažené při vývoji derivátů inzulinu s preferenčním působením v játrech a diskutujeme jejich potenciál pro léčbu cukrovky.

Klíčová slova: inzulin, analog, cukrovka, receptor inzulinu, izoforma, vazebná afinita, hepatoselektivita

Summary

Jiráček J. et al.: Perspectives of insulin derivatives with preferential action in the liver

Diabetes mellitus is a serious metabolic disease caused by the inability of the body to produce or respond to insulin. The lives of millions of diabetic patients are saved by regular subcutaneous administration of insulin. Despite 100 years of research on insulin, its administration to patients is still not optimized because it differs from the physiological action, where insulin is secreted from the pancreas first to the liver, where it performs important physiological functions, and then to the periphery of the body. The delayed action of insulin in the liver after subcutaneous administration causes imbalances in patients' glycaemia and thus health complications. In this paper, we summarize the results obtained in the development of insulin derivatives with preferential action in the liver and discuss their potential for the treatment of diabetes.

Keywords: insulin, analogue diabetes mellitus, insulin receptor, isoform, binding affinity, hepatoselectivity

MIKROFLUIDNÍ PCR S VYUŽITÍM PŘÍSTROJE BIOMARK X: VYSOKOKAPACITNÍ METODA ANALÝZY (NEJEN) GENOVÉ EXPRESE

Martina Novotná, Eva Jablonská

Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemickotechnologická v Praze, stankovq@vscht.cz

Úvod

Genová exprese (GE) je proces, při kterém se syntetizuje genový produkt na základě informací poskytovaných deoxyribonukleovou kyselinou (DNA). Analýza GE hraje klíčovou roli pro naše porozumění buněčné fyziologie, genetických chorob a progresu onemocnění^{1, 2}.

K detekci hladin GE na úrovni mRNA (neboli sledování relativní míry transkripce, zkr. RMT) jsou nejčastěji používané laboratorní techniky Northern blotting, kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR), DNA čip (DNA microarray) a RNA sekvenování (RNA-Seq)¹. Běžný způsob měření RMT sestává z několika kroků, včetně odběru vzorků, izolace RNA, reverzní transkripce na cDNA a následné amplifikace pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Tyto kroky jsou obecně použitelné pro většinu metod měření RMT, ať už jde o microarray, RNA-Seq nebo qPCR¹.

Současné techniky pro analýzu RMT jsou neustále vyvíjeny a zdokonalovány. Jedním z nových systémů, který poskytuje několik výhod je přístroj Biomark X. Jedná

se o inovativní přístroj, který na základě PCR v mikrofluidním uspořádání umožňuje (nejen) analýzu genové exprese³.

Technologie založené na mikrofluidice

Hlavní myšlenkou mikrofluidiky je začlenit operace, které často vyžadují celou laboratoř, do malého, jednoduchého systému. Mikrofluidika zpracovává velmi malé objemy tekutin, až po femtolitry (fL). Tekutiny v mikrofluidním čipu jsou směrovány, míchány, separovány nebo jinak upravovány za účelem detekce více analytů v jednom vzorku (angl. multiplexing), automatizace a vysokokapacitního uspořádání. Tuto technologii lze využít například pro již zmíněnou PCR, ale i pro elektroforézu, nebo chromatografii⁴.

Pro PCR nabízí mikrofluidika celou řadu výhod: automatizaci při přípravě reakcí, rychlejší analýzu díky kratším reakčním/separačním dobám, paralelní zpracování vzorků, nízkou spotřebu činidla a snížené náklady na analýzu⁵.

Tab. 1 – Srovnání příkladů přístrojů fungujících na podobném principu jako Biomark X⁶⁻⁹

Název přístroje	Firma	Princip	Využití	Výhody	Objem / Počet reakcí
Biomark X	Fluidigm	Mikrofluidický systém (PCR)	Analýza genové exprese, genotypizace, kvantifikace DNA/RNA	Multiplex, automatizace, vysoká přesnost a citlivost, tisíce reakcí	6,7 nl / 9216
OpenArray System	Thermo Fisher Scientific (Applied Biosystems)	Mikrofluidický systém (PCR)	Genová analýza, kvantifikace DNA/RNA	Vysoká hustota reakcí na čipu, zmenšené reakční objemy	33 nl / 3072

Mikrofluidiku využívá i další důležitá technika - digitální PCR (dPCR). Jejím principem je rozdělení reakční směsi na PCR do mnoha dílčích reakcí (tzv. mikroobjemů) již před amplifikací. Výsledky mohou přesně určit počet kopií a tím i koncentrace vzorků nukleových kyselin bez nutnosti použití standardů. Některé přístroje obě možnosti kombinují - umožňují na čipu buď provedení vysokokapacitní PCR (jedna pozice čipu = jedna samostatná reakce), nebo provedení dPCR (jedna pozice čipu = jeden mikroobjem).

Specifikace přístroje Biomark X

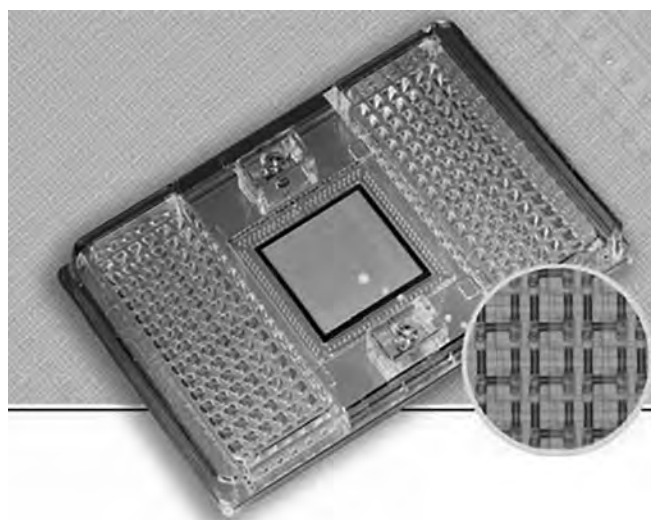
BioMark X je automatizovaný, vysokokapacitní PCR systém, který využívá technologii mikrofluidiky, konkrétně integrované fluidní obvody (angl. Integrated Fluidic Circuit, zkr. IFCs) Tyto obvody slouží ke zpracování vzorků v objemech nanolitů na zařízení o velikosti běžné 96jamkové destičky. Lze jej využít pro genovou expresi,

genotypizaci, identifikaci vzorků, analýzu variací počtu kopií (CNV) a PCR v reálném čase⁶.

Dynamický systém IFCs podporované Biomarkem X s nejvyšší kapacitou je „96.96 Dynamic Array IFC for Gene Expression“, který je schopen provést 9 216 reakcí po zkombinování 96 vzorků a 96 testů a to v jediném 3,5hodinovém běhu přístroje⁶. 7. Díky tomuto způsobu je možná paralelní analýza široké škály cílů. Malý reakční objem, který činí 6,7 nl, navíc snižuje náklady na činidla a zvyšuje efektivitu⁷. Při analýze genové exprese na platformě Biomark X se k monitorování postupu PCR reakce používají interkalační barviva, jako je EvaGreen. Lze použít i specifické hydrolyzační sondy³. Přístroj je schopen excitace a detekce emitovaného fluorescenčního signálu o různých vlnových délkách (tabulka 2)⁶. Díky této schopnosti lze provádět čtení ve třech kanálech, což umožňuje detekci různých fluoroforů i multiplexování.

Tab. 2 – Kompatibilní fluorofory a jejich vlnové délky pro systém Biomark X^{10, 11}

Fluorofor	Vlnová délka excitace (nm)	Vlnová délka emise (nm)
EvaGreen	499	526
FAM	495	520
VIC (či HEX)	538	554
Libovolný fluorofor	V rozmezí 465 a 505	V rozmezí 500 a 550
Libovolný fluorofor	V rozmezí 510 a 550	V rozmezí 540 a 600

**Obr. 1** – přístroj Biomark X⁶**Obr. 2** – Mikrofluidní čip pro přístroj Biomark X⁷

Postup analýzy genové exprese s přístrojem Biomark X

První kroky analýzy již byly zmíněny v úvodu: Analýza začíná buněčnou lyzí a izolací RNA z buněk. Následuje reverzní transkripce, kdy z RNA vzniká cDNA (komplementární DNA). Před samotnou kvantitativní PCR je výrobce doporučeno provést tzv. pre-amplifikaci. cDNA je amplifikována pomocí směsi všech specifických primerů, které cílí na geny zájmu^{3, 5}. Pre-amplifikace se provádí, protože objem reakce na čipu je velmi malý (v jednotkách nl) a mohlo by dojít k získání falešně negativních výsledků¹². V některých případech (abundantní cílové sekvence) není třeba preamplifikaci provádět¹³. Existuje obava, že během pre-amplifikace dojde k selektivnímu namnožení pouze některých oblastí zájmu kvůli přítomnosti desítek párů primerů a jejich možným nežádoucím interakcím¹⁴. Před samotným nanesením vzorků je zapotřebí připravit mikrofluidní čip aplikací oleje, aby se uzavřely ventily rozhraní, čímž se zabrání předčasnému smíchání vzorků a primerů do čipu. Následuje aplikace vzorků (vzorky cDNA předem smíchané s master-mixem), do jedné části destičky a aplikace sad primerů (popř. sad primerů a sond) do druhé části destičky. V následujícím kroku „Naplnění“ je dynamický systém umístěn na řídicí jednotku IFC a pomocí softwarového rozhraní je použit tlak k naplnění komponentů analýzy do reakčních komor. Komponenty analýzy se automaticky kombinují na čipu^{3, 7}. Systém si automaticky přenáší destičku na moduly, kde probíhá real-time PCR (cyklické změny teplot) a fluorescenční detekce. Na závěr se získaná data analyzují za použití volně dostupného softwaru (SBI real-time PCR). Je možné importovat rozložení destičky s informacemi o názvech vzorků, primerů, referenčních genech, jednoho referenčního vzorku, zobrazit amplifikační křivky, křivky tání, zobrazit tepelné mapy (heatmaps) a vypočítat relativní míru transkripce^{3, 7, 11}. Pro pokročilejší funkce je třeba exportovat hodnoty Cq pro jednotlivé vzorky ve formátu cvs a dále s daty pracovat například v programu R – existuje balíček s názvem fluidgr, který umožňuje import dat ve formátu cvs do programu R a dále například normalizaci dat či různé formy vizualizace¹⁵. Importovaná data je také možné zpracovávat pomocí dalších dostupných balíčků (např. ReadqPCR a NormqPCR).

Další možnosti využití přístroje Biomark X

Biomark X je přístroj, který má mnoho využití. Usnadnění sledování genové exprese, které umožňuje profilovat úroveň exprese pro více genů současně, což umožňuje studium genové regulace, porozumění molekulárních mechanismů nemocí apod., je pouze jednou z možných aplikací. Biomark X je také schopen genotypizace, což je proces identifikace genetických variant v genomu jedince. Tímto způsobem je možné zkoumat specifické genetické znaky a rozdíly mezi jedinci. Pod genotypizaci řadíme také analýzu SNP (Single Nucleotide Polymorphisms). Jedná se o jednobázové variace v sekvencích DNA, které mohou významně ovlivnit vlastnosti organismu. Další možnost využití je pro analýzu variace počtu kopií DNA (Copy

Number Variation - CNV), kdy je přístroj schopen přesné kvantifikace změn v počtu kopií DNA. Přístroj je také možné využít pro identifikaci a charakterizaci mikroorganismů např. různých klinicky významných patogenů. Navíc je pomocí Biomark X možná analýza jednotlivých buněk, čehož může být využito pro studium buněčné heterogenity a dynamiky. Tato metoda nám umožňuje detailně prozkoumat jednotlivé buňky v rámci komplexních buněčných populací a získat důležité informace o interakcích, genové expresi a funkcích buněk^{3, 6, 7, 16}.

Závěr

Biomark X má díky svému mikrofluidnímu designu a díky své schopnosti provádět multiplex analýzu jedinečné vlastnosti pro analýzu genové exprese, která je klíčová pro studium a porozumění biologických procesů. S neustálým rozvojem mikrofluidiky a přístrojů na její bázi se otevírají nové možnosti ve studiu nejen genové exprese.

Poděkování

Děkujeme firmě Dynex za zapůjčení přístroje Biomark X na Ústav biochemie a mikrobiologie a jmenovitě Ing. Jakubovi Polákovi za pomoc při analýze vzorků.



Obr. 3 – Schéma analýzy genové exprese pomocí přístroje Biomark X

Literatura

1. Singh K P, Miaskowski C, Dhruva AA, et al.: *Biol Res Nurs* 20, 369 (2018)
2. <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Gene-Expression> (, staženo.20. května 2023.
3. Sanchez-Freire V, Ebert AD, Kalisky T, et al.: *Nat Protoc* 7, 829 (2012)
4. <https://www.elveflow.com/microfluidic-reviews/general-microfluidics/a-general-overview-of-microfluidics/> (, staženo 13. května 2023.
5. <https://www.elveflow.com/microfluidic-reviews/general-microfluidics/microfluidic-pcr-qpcr-rtpcr/>, staženo 13. května 2023.
6. <https://labroots-public.s3.amazonaws.com/Biomark%20X%20brochure%20Rev%2003.pdf>, staženo 11. května 2023.
7. <https://www.gene-quantification.de/flyer-biomark-96x96.pdf>, staženo 11. května 2023.
8. https://www.accela.eu/files/products/124/lcn_50_08308_rev_a_raindrop_plus_product_brief.pdf, staženo 18. července 2023.
9. https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/cms_088717.pdf, staženo 17. července 2023.
10. <https://eu.idtdna.com/pages/education/decoded/article/sun-fluorophore-a-molecular-equivalent-to-vic>, staženo 27. července 2023.
11. https://s3-us-west-2.amazonaws.com/oww-files-public/6/69/Fluidigm_RT_PCR_Analysis_brief_manual_07302010.doc, staženo 15. 5. 2023.
12. Xie X, Gjorgjieva T, Attieh Z, et al.: *Processes* 8, 1425 (2020)
13. Okino ST, Kong M, Sarras H, et al.: *Biomol. Detect. Quantif.* 6, 13 (2016)
14. Brown SS, Chen YW, Wang M, et al.: *Biol Methods Protoc* 2, bpx006 (2017)
15. <https://othomantegazza.github.io/fluidgr/index.html>, staženo 1. srpna 2023.
16. Cutler DJ, Zwick ME, Carrasquillo MM, et al.: *Genome Res* 11, 1913 (2001)

Souhrn

Novotná M., Jablonská E.: Mikrofluidní PCR s využitím přístroje Biomark X: Vysokokapacitní metoda analýzy (nejen) genové exprese

Mikrofluidika je inovativní obor, který se zabývá zpracováním malého množství kapaliny v mikrokanálech. V kombinaci s pokročilými analytickými technikami, jako je např. mikrofluidní PCR, nabízí významné výhody nejen pro analýzu genové exprese. Tato metoda využívá mikrokanály a mikroventily k přesnému dávkování a míchání činidel, čímž se minimalizuje spotřeba vzorku a činidla a také čas strávený pipetováním. Tyto vlastnosti činí mikrofluidní PCR ideální pro analýzu genové exprese, kde je vyžadováno podrobné monitorování a kvantifikace mRNA. Jedním z přístrojů umožňujícím mikrofluidní PCR je Biomark X. Díky své schopnosti multiplexování a také díky svému mikrofluidnímu designu umožňuje analýzu mnoha vzorků současně. Tato pokročilá technologie má široké uplatnění v biologickém výzkumu, diagnostice a personalizované medicíně a nabízí nové příležitosti k objevování a pochopení genetických procesů.

Klíčová slova: mikrofluidika, genová exprese, mikrofluidní PCR, kvantitativní PCR

Summary

Novotná M., Jablonská E.: Microfluidic PCR utilizing the Biomark X instrument: A high-throughput method for (not only) gene expression analysis

Microfluidics is an innovative science that deals with the manipulation of small volumes of fluid in microchannels. In combination with advanced analytical techniques such as microfluidic PCR, it offers significant advantages not only for gene expression analysis. Microfluidic PCR enables PCR reactions to be performed using very small sample volumes, as it utilizes microchannels and microvalves for precise reagent dispensing and mixing. This fact increases both sensitivity and accuracy of the analysis. The Biomark X instrument utilizes microfluidic PCR for gene expression analysis, as it is ideal for mRNA quantification. With its multiplexing capability and microfluidic design, it enables the analysis of multiple samples simultaneously. This advanced technology finds broad applications in biological research, diagnostics, and provides new opportunities for the discovery and understanding of genetic processes.

Keywords: microfluidics, gene expression, microfluid PCR, quantitative PCR

HYPERTHYROXINEMIE

Radovan Bílek

Endokrinologický ústav v Praze; rbilek@endo.cz

Úvod

Laboratorní diagnostika štítné žlázy závisí na několika předpokladech, které jsou důležité při interpretaci imunoanalyticky stanovených výsledků. Prvním předpokladem je, že tyreotropin (TSH), který ovládá téměř veškerou činnost štítné žlázy, má logaritmickou odezvu na tyreoidální hormony (TH) thyroxin (T4) a trijodtyronin (T3). Z tohoto důvodu má důležitou úlohu v laboratorní diagnostice štítné žlázy a je často prvním měřítkem diagnostického kritéria. Druhým předpokladem je, že biologicky aktivní jsou pouze volné frakce TH, tj. ty frakce, které nejsou vázány na vazebné (transportní) proteiny, jako je TBG (thyroid-binding globulin), transthyretin nebo albumin. Volné frakce TH jsou v cirkulaci v pikomolovém množství, zatímco celkové TH jsou v nanomolární koncentraci. Třetím předpokladem je, že biologická aktivita dané látky nemusí vždy přesně odpovídat imunologické kvantitě.

Za normálních podmínek eutyroidního stavu spadá sérová koncentrace TSH do normálního referenčního rozmezí, které je rovno pro dospělé jedince hodnotě 0,27 – 4,20 mIU/L. Také hodnoty TH jsou v normálním referenčním rozmezí, které jsou pro dospělé jedince rovny 12 – 22 pmol/L pro volnou frakci T4 (FT4), 3,1 – 6,8 pmol/L pro volnou frakci T3 (FT3), 66 – 181 nmol/L pro celkový T4 a 13 – 31 nmol/L pro celkový T3.

Klinicky se manifestující hypo/hypertyreóza má hodnoty TSH mimo referenční rozmezí a také hodnoty TH jsou reciproce mimo referenční rozmezí. Subklinická hypo/hypertyreóza má hodnoty TSH mimo referenční rozmezí, ale hodnoty TH spadají do referenčního rozmezí. Centrální hypo/hypertyreóza má snížený nebo zvýšený TSH a stejně tak i TH. Poslední patofyziologický stav štítné žlázy se označuje jako dystyreonemie a je

zajímavý tím, že je v protikladu s prvním předpokladem laboratorní diagnostiky štítné žlázy. V tomto případě je TSH v normálním referenčním rozmezí, ale hodnoty TH spadají mimo referenční rozmezí.

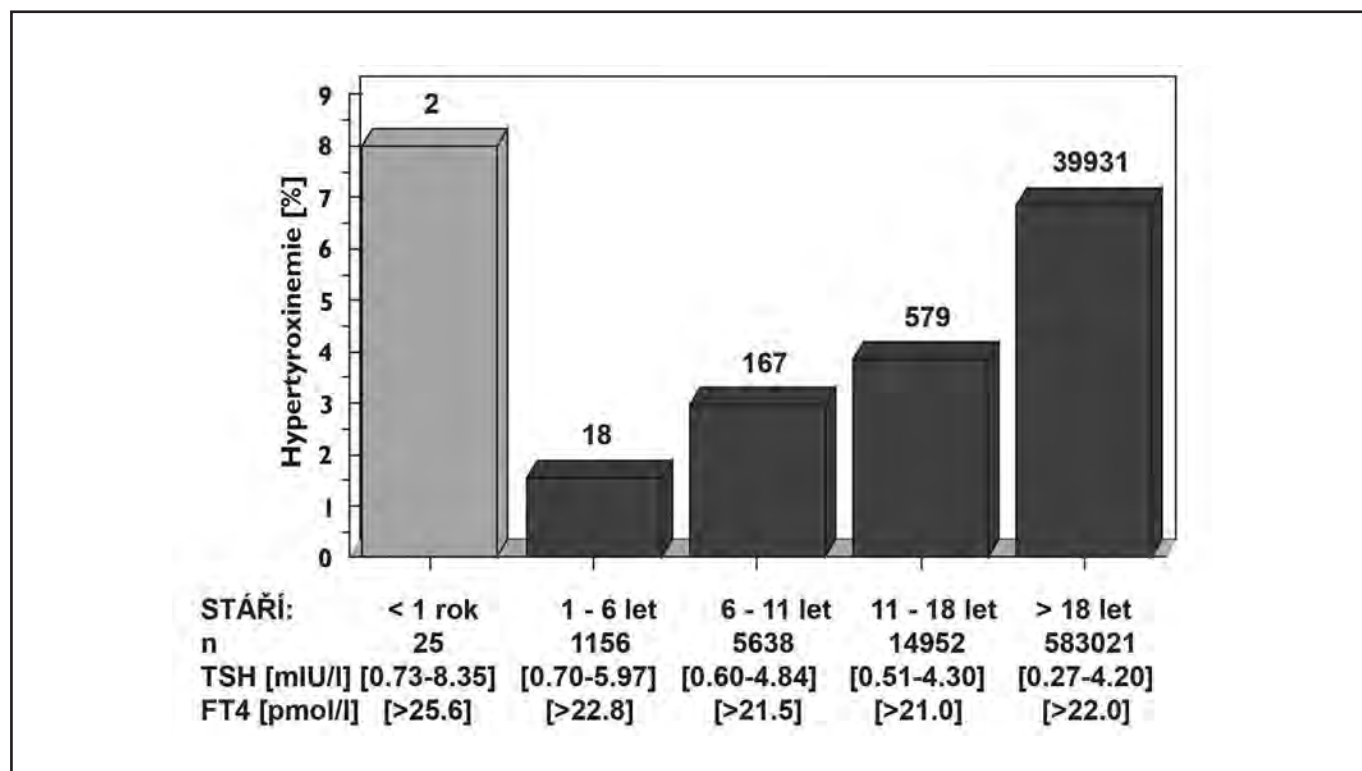
V práci jsou uvedeny výsledky naší laboratorní diagnostiky za období 2003 až 2022 týkající se hyperthyroxinemie, tj. paralelního stanovení TSH a FT4, kde TSH je v referenčním rozmezí, ale výsledky FT4 jsou vyšší než odpovídající referenční rozmezí. Jsou diskutovány příčiny, proč je frekvence tohoto stavu relativně vysoká a jaké opatření je možné přijmout, aby byl tento patofyziologický stav limitován. Pokud jde o log/lineární inverzní relaci mezi TSH a FT4 v cirkulaci, hyperthyroxinemie není normálním fyziologickým stavem štítné žlázy.

Metody a výsledky

Paralelně stanovené analýzy TSH a FT4 byly zpracovány pomocí statistického programu NCSS (Number Cruncher Statistical Systems, Kaysville, Utah, USA). Na základě statistického vyhodnocení výsledků diagnostiky štítné žlázy získaných v Endokrinologickém ústavu v Praze v období 2003–2022, které byly stanoveny pomocí imunoanalytických systémů firmy Roche Diagnostics GmbH, Německo pracujících v režimu ECLIA (elektrochemiluminiscenční imunoanalýza), jsme zjistili relativně vysoký výskyt hyperthyroxinemie. Paralelní analýza TSH a FT4 byla provedena u 818277 stanovení. Z toho počet analýz, kdy TSH spadalo do normálního referenčního rozmezí, byl 604792 (100 %) a hyperthyroxinemie, kdy hodnota FT4 byla vyšší než horní bod referenčního rozmezí, zatímco koncentrace TSH byla normální, měla hodnotu 6,7 %. Rozdělení podle pohlaví pacientů s normálními koncentracemi TSH a koncentracemi FT4 přesahujícími horní bod referenčního

Tab I. Laboratorní diagnostika štítné žlázy na základě referenčního rozmezí pro TSH a TH.

Diagnóza		TSH	Tyreoidální hormony
Klinická	Hypertyreóza	snížené	zvýšené
	Hypotyreóza	zvýšené	snížené
Subklinická	Hypertyreóza	snížené	normální
	Hypotyreóza	zvýšené	normální
Centrální	Hypertyreóza	zvýšené	zvýšené
	Hypotyreóza	snížené	snížené
Dystyreonemie	Hypertyreonemie	normální	zvýšené
	Hypotyreonemie	normální	snížené

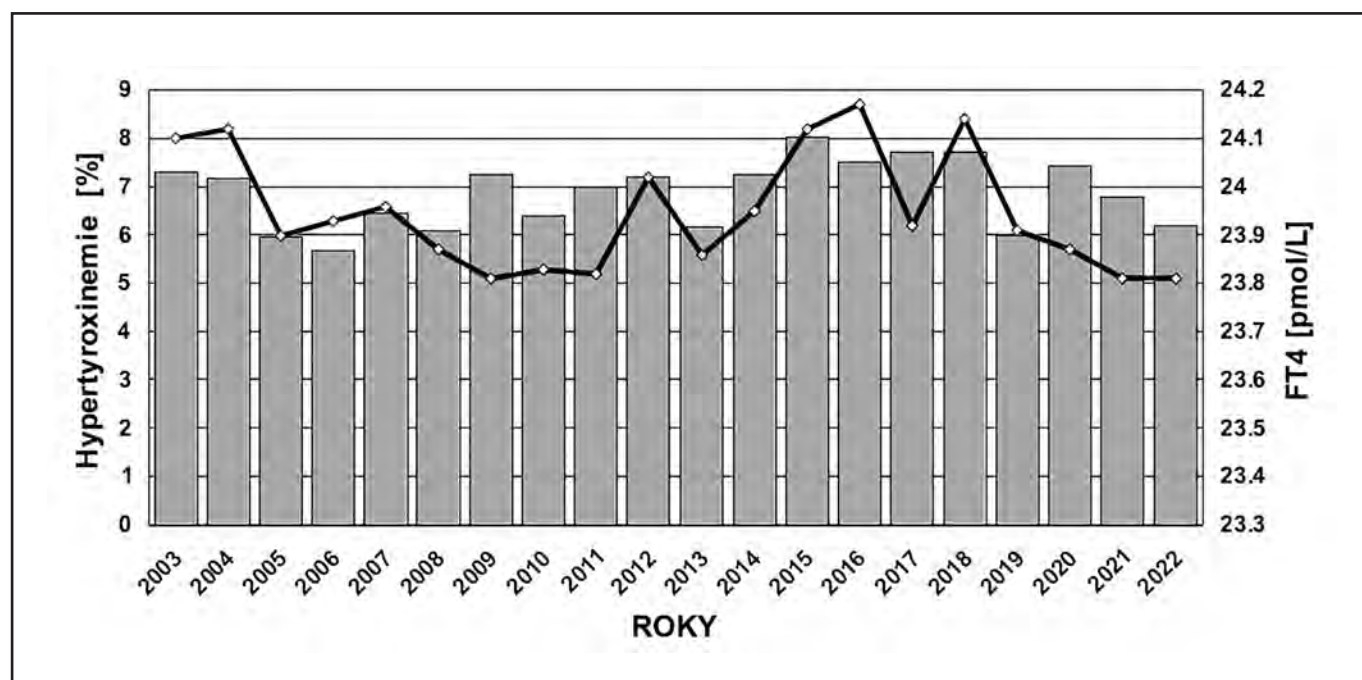


Obr. 1 Hyperthyroxinémie podle stáří jedinců. Na ose X jsou skupiny podle stáří a je zde uveden počet n, přičemž počet jedinců s hyperthyroxinémií je znázorněn na vrcholu každého sloupce. Poslední 2 řádky uvádějí referenční rozmezí TSH a horní bod referenčního rozmezí pro FT4 pro dané věkové skupiny.

rozmezí (ženy n = 34434, FT4 průměr (AVG) 23,91 ± ± směrodatná odchylka (SD) 2,27 pmol/L; muži n = 5885, FT4 AVG 24,19 ± SD 2,89 pmol/L) ukázalo, že žen s hyperthyroxinémií je přibližně 6x více než mužů.

Hyperthyroxinémie podle data narození je znázorněna na obr. 1. Pacienti byli rozděleni podle stáří do

skupin 0 – 1 rok, 1 – 6 roků, 6 – 11 roků, 11 – 18 roků, dospělí starší 18 let. Na ose X je uveden počet jedinců patřících do dané věkové skupiny a na vrcholu sloupce je uveden počet jedinců s hyperthyroxinémií. Dále je uvedeno referenční rozmezí pro TSH a horní bod referenčního rozmezí pro FT4 příslušející dané věkové skupině. Do statistického zpracování není možné zařa-



Obr. 2 Hyperthyroxinémie (sloupce) a průměrné hodnoty FT4 (křivka) podle roku, kdy bylo prováděno paralelní stanovení TSH a FT4.

dit skupinu mladší než 1 rok, protože za celé období 2003 – 2022 jsme zpracovali pouze 25 takto starých dětí. Z obr. 1 vyplývá, že se zvyšujícím se věkem stoupá počet hyperthyroxinemií až do hodnoty kolem 7 % charakteristických pro dospělé jedince.

Zkoumali jsme také hyperthyroxinémii podle roku, kdy byla analýza provedena. Výsledky jsou na obr. 2 a je z nich patrné, že neexistuje trend poklesu nebo zvýšení hyperthyroxinémie v závislosti na roku analýzy. Hodnoty hyperthyroxinémie se pohybují okolo 7 % a hodnoty FT4 okolo 23,9 pmol/L. Výsledky jsou znázorněny na obr. 2.

Diskuse

Příčiny hyperthyroxinémie je třeba zkoumat jak z analytického, tak i z klinického hlediska. Z analytického hlediska se jedná především o aplikaci levothyroxinu pacientům ráno nalačno před odběrem krve a další příčinou je protilátková interference. Z klinického hlediska je nutné uvažovat variabilitu ve vazebných (transportních) proteinech a léky vytěsňující TH z těchto proteinů, syndrom rezistence vůči TH, změněnou biologickou aktivitu TSH, porušenou funkci dejdasy a vliv endokrinních disruptorů působících na štítnou žlázu. Obecně je ale analytické hledisko významnější, neboť frekvence příčin spočívajících v rámci klinického hlediska je omezená.

Analytické příčiny hyperthyroxinémie

Změny v koncentraci sérového T4 po podání 400 µg levothyroxinu byly popsány v časopise *Thyroid*¹. Autoři ověřovali funkci složitěho počítačového modelu řešícího průběh zpětné vazby na ose hypothalamus-hypofýza-štítná žláza po absorpci levothyroxinu a z tohoto důvodu sbírali po dobu 120 hodin farmakokinetická data paralelně stanovených TSH, T4 a T3 u zdravých eutyreoidních dobrovolníků. Během času sběru naměřili celkem 33 paralelně stanovených koncentrací TSH, T4 a T3. Po 24 hodinách sledování byl dobrovolníkům podán nalačno levothyroxin a zkoumal se průběh změn v koncentraci T4, T3 a TSH. Do 3 hodin po podání vzrůstala koncentrace T4 a dalších přibližně 6 hodin od vrcholu píku se hladina T4 postupně snižovala. Podobné výsledky pro T4 i FT4 byly naměřeny i jinými autory^{2, 3}. Zvýšená koncentrace sérového FT4 s vrcholem 3 hodiny po podání levothyroxinu, která klesá na normální hladinu dalších přibližně 6 hodin, může podstatně ovlivnit výsledky stanovení FT4. Z tohoto důvodu je nutné doporučit předepisujícím lékařům, aby pacienty poučili, že si mohou vzít levothyroxin až po odběru krve.

Z analytického hlediska mohou být závažné interference při stanovení FT4 a TSH způsobeny přítomností endogenních nebo heterofilních autoprotiilátek a revmatoidních faktorů ve vzorcích séra. Interference vedoucí k falešně vysokému nebo nízkému výsledku ovlivňuje konkrétní vzorek a nemusí být zjevná navzdory nejprísnejším laboratorním kontrolním schémátům⁴. Endogenní lidské autoprotiilátky vůči TH jsou často spojovány s autoimunitními a jinými zánětlivými onemoc-

němi. V menší míře se vyskytují i u zdánlivě zdravých lidí⁵. TH jsou syntetizovány na tyreoglobulinu, který je jedním z hlavních autoantigenů při autoimunitním onemocnění štítné žlázy⁶. Prevalence autoprotiilátek proti TH stanovené polyethylenglykolovou precipitací radioaktivně značeného komplexu T4 – autoprotiilátka měla hodnotu 1,8 % v běžné populaci a až 30 % u pacientů s autoimunitním onemocněním štítné žlázy⁷. Jiní autoři uvádějí, že prevalence autoprotiilátek vůči TH je 7 % u hypotyreózy, 1,5 % u hypertyreózy a 7,5 % u ne-tyreoidních autoimunitních stavů⁸. Ve vzorcích majících vysoký výskyt antimikrozmálních a/nebo antityreoglobulinových protiilátek jsou v 80 – 100 % případů přítomny i autoprotiilátky proti hormonům štítné žlázy⁹. Na rozdíl od autoprotiilátek vůči TH jsou autoprotiilátky proti TSH vzácné⁹.

Heterofilní protiilátky jsou lidské anti-zvířecí protiilátky (např. HAMA – lidské anti-myší protiilátky) nebo proteiny, jako jsou revmatoidní faktory, které se vážou na zvířecí specifické analytické protiilátky používané v imunoanalýzách⁵. Vznikají buď jako výsledek těsného kontaktu se zvířaty, nebo po injekci myších monoklonálních protiilátek pro diagnostické nebo terapeutické účely¹⁰. Prevalence heterofilních protiilátek (HAMA) byla 3,1 % v obecné populaci (n = 2600)¹¹. Revmatoidní faktory jsou přítomny asi u 5 % běžné populace, ale jejich výskyt je až 70 % u revmatoidních pacientů⁹. Heterofilní protiilátky mohou způsobovat pozitivní i negativní interference v imunometrických (sendvičových) testech na bázi monoklonálních protiilátek, ale častěji podléhají pozitivní interferenci¹², protože mohou spojit primární imobilizované analytické protiilátky se značenými signálními protiilátkami i bez přítomnosti měřeného antigenu. Vytváří tak falešný sendvič, ve kterém je stanovovaný antigen nahrazen heterofilní protiilátkou. Vede to např. k falešně vysoké hodnotě TSH.

V kompetitivních imunotestech blokování analytických protiilátek heterofilními nebo endogenními protiilátkami způsobuje falešné zvýšení měřeného analytu. Vysoká afinita antigenu a značeného antigenu k analytické protiilátce však ve srovnání s heterofilní nebo endogenní protiilátkou minimalizuje interferenci v kompetitivní imunoanalýze celkových TH¹². Naproti tomu u stanovení volných frakcí TH endogenní autoprotiilátky vůči TH omezují dostupnost signálního antigenu a výsledkem je falešně vysoká koncentrace stanovovaného antigenu, jako je např. FT4.

Klinické příčiny hyperthyroxinémie

Variabilita koncentrací TBG, transthyretinu a albuminu, které jsou vazebnými (transportními) proteiny pro TH, je nejčastějším zdrojem dystyreonémie pro celkové frakce TH¹³. Principiální je TBG s nejvyšší afinitou k TH. Jeho biosyntézu v játrech zvyšují estrogény (a také antikoncepce) a snižují androgeny nebo glukokortikoidy. Akutní onemocnění, jiná onemocnění a léky také ovlivňují koncentraci a vazebnou afinitu TBG^{14, 15}. Nadbytek transportních proteinů způsobuje hypertyreoniemi celkových TH, ale volné frakce TH jsou obvykle v eutyreoidním rozmezí. Zdá se však, že existuje částeč-

ná závislost imunoanalytického stanovení volných TH na transportních proteinech pro TH se stejnými důsledky jako pro stanovení celkových TH¹⁶.

Hyperthyroxinémii způsobuje nadbytek TBG, který může být dědičný i iatrogenní a je nejzřetelnější při měření celkového T₄, ale může ovlivňovat i stanovení FT₄^{15, 16}. Hyperthyroxinémie spojená s transthyretinem byla nalezena například u pacientů s variantou transthyretinu, ve které methionin nahrazuje threonin na pozici 119, což je vazebné místo proteinu pro jodothyronin. Tato varianta transthyretinu vykazuje zvýšenou T₄ vazebnou afinitu¹⁷. Familiární dysalbuminemická hypertyroxinémie je autozomálně dominantní stav s defektem v genu *ALB*. Mutantní albumin má přibližně 60× vyšší afinitu k T₄ než normální albumin, výsledkem jsou falešně vysoké hladiny FT₄ nebo T₄ v imunotestech¹⁸⁻²⁰. Měření T₃ obvykle není ovlivněno¹⁶. Prevalence familiární dysalbuminemické hypertyroxinémie je vzácná a byla zjištěna pouze u 0,17 % z 15674 vzorků od obou pohlaví²¹.

Hyperthyroxinémie může být způsobena i v důsledku syndromu nepřiměřené sekrece TSH, který je pozorován u pacientů s rezistencí na hormony štítné žlázy nebo kteří trpí adenomem hypofýzy secernujícím TSH se změněnou biologickou aktivitou. Rezistence na hormony štítné žlázy je autozomálně dominantní stav. Asi 90 % případů je způsobeno mutací genu *THRB*, který produkuje defektní beta receptor pro hormony štítné žlázy a narušuje tak smyčku negativní zpětné vazby v ose hypothalamus-hypofýza-štítná žláza²². Pozměněná glykosylace molekuly TSH produkované adenomem může změnit konfiguraci nebo konformaci epitopů na molekule TSH²³. Za těchto okolností nemusí být biologická aktivita TSH v souladu s imunometrickou

aktivitou měřeného TSH. Jiná onemocnění štítné žlázy mohou také způsobit rozdíly v glykosylaci TSH s následnou změnou afinity interakcí mezi měřeným TSH, TSH kalibrátorem a specifickými protilátkami²⁴. U pacientů s deficitem nebo porušenou funkcí deiodasy typu 2 bylo zjištěno zvýšení FT₄ při normálním TSH a FT₃²⁵.

Řada léků, včetně salicylátu, fenytoinu, karbamazepinu, furosemidu a heparinu, narušuje vazebnou rovnováhu vytěsněním hormonů štítné žlázy z jejich vazebných proteinů^{5, 26, 27}. Stejný efekt mají neesterifikované mastné kyseliny, které mohou vznikat při skladování vzorku nebo jako efekt podání heparinu s následnou mobilizací lipoproteinové lipasy¹⁰. Výsledkem je zvýšení FT₄, zatímco TSH se zásadně nemění. Hypertyroxinémie může být také pozorována u pacientů léčených amiodaronem¹⁵.

Závěr

Hyperthyroxinémie v systému TSH-FT₄ je často způsobena podáním levothyroxinu krátce před tyreoidální analýzou krve. Hyperthyroxinémie je způsobena také přítomností endogenních autoprotiátů vůči T₄ především u pacientů s autoimunním onemocněním štítné žlázy. Frekvence výskytu hypertyroxinémie z ostatních příčin není tak závažná. Hyperthyroxinémie je asociována s onemocněním štítné žlázy. Hyperthyroxinémie u obecné eufunkční populace (náhodný výběr z populačních studií v různých krajích České republiky, n = 3455) měla hodnotu pouze 0,67 %, tj. byla 10x nižší než u pacientů Endokrinologického ústavu.

Poděkování

Práce byla podpořena MZ ČR - RVO (Endokrinologický ústav - EÚ, 00023761).

Literatura

1. Eisenberg M, Samuels M, DiStefano JJ 3rd: *Thyroid* 18, 1071 (2008)
2. Caron P, Grunenwald S, Persani L, et al.: *Rev Endocr Metab Disord* 23, 463 (2022)
3. Carpi A, De Gaudio C, Cirigliano G, et al.: *Thyroidology* 5, 9 (1993)
4. Zhou Q, Li S, Li X, et al.: *Clin Chem Lab Med* 44, 1363 (2006)
5. Jones AM, Honour JW: *Clin Endocrinol (Oxf)* 64, 234 (2006)
6. Ando T, Yasui J, Inokuchi N, et al.: *Intern Med* 46, 1225 (2007)
7. Sakata S, Matsuda M, Ogawa T, et al.: *Clin Endocrinol (Oxf)* 41, 365 (1994)
8. Vyas SK, Wilkin TJ: *J Endocrinol Invest* 17, 15 (1994)
9. Després N, Grant AM: *Clin Chem* 44, 440 (1998)
10. Stockigt JR, Lim CF: *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 23, 753 (2009)
11. Vaidya HC, Beatty BG: *Clin Chem* 38, 1737 (1992)
12. Kricka LJ: *Clin Chem* 45, 942 (1999)
13. Bilek R, Starka L, Zamrazil V: *Horm Mol Biol Clin Invest* 8, 499 (2011)
14. Baloch Z, Carayon P, Conte-Devolx B, et al.: *Thyroid* 13, 3 (2003)
15. Bartalena L, Bogazzi F, Brogioni S, et al.: *Horm Res* 45, 142 (1996)
16. Dufour DR: *Endocrinol Metab Clin North Am* 36, 579 (2007)
17. Almeida MR, Damas AM, Lans MC, et al.: *Endocrine* 6, 309 (1997)
18. Cartwright D, O'Shea P, Rajanayagam O, et al.: *Clin Chem* 55, 1044 (2009)
19. Hoshikawa S, Mori K, Kaise N, et al.: *Thyroid* 14, 155 (2004)
20. Petitpas I, Petersen CE, Ha CE, et al.: *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 6440 (2003)
21. Arevalo G: *Clin Chem* 37, 1430 (1991)
22. Pohlenz J, Weiss RE, Macchia PE, et al.: *J Clin Endocrinol Metab* 84, 3919 (1999)
23. Beck-Peccoz P, Piscitelli G, Amr S, et al.: *J Clin Endocrinol Metab* 62, 704 (1986)
24. Donadio S, Pascual A, Thijssen JH, et al.: *Clin Chem* 52, 286 (2006)
25. Dumitrescu AM, Di Cosmo C, Liao XH, et al.: *Antioxid Redox Signal* 12, 905 (2010)
26. Hawkins RC: *Clin Chem* 44, 2550 (1998)
27. Laji K, Rhidha B, John R, et al.: *QJM* 94, 471 (2001)

Souhrn

Bílek R.: Hyperthyroxinémie

Hyperthyroxinémie je stav, kdy hodnoty TSH v krvi jsou v normálním referenčním rozmezí, ale hodnoty thyroxinu jsou vyšší než referenční rozmezí. Na základě statistického vyhodnocení výsledků diagnostiky štítné žlázy získaných v Endokrinologickém ústavu v Praze v období 2003 – 2022, které byly stanoveny pomocí imunoanalytických systémů firmy Roche Diagnostics GmbH, Německo pracujících v režimu ECLIA (elektrochemiluminiscenční imunoanalýza), jsme zjistili relativně vysoký výskyt hyperthyroxinémie, jejíž hodnota byla 6,7 % z celkem 604792 stanovení, kde TSH byl normální. Hyperthyroxinémie v systému TSH-FT4 je často způsobena podáním levothyroxinu krátce před tyreoidální analýzou krve. Hyperthyroxinémie je způsobena také přítomností endogenních autoprotilátek vůči T4 především u pacientů s autoimunním onemocněním štítné žlázy. Frekvence výskytu hyperthyroxinémie z ostatních příčin není tak závažná.

Klíčová slova: tyreotropin, thyroxin, volná frakce thyroxinu, hyperthyroxinémie, imunoanalýza

Summary

Bílek R.: Hyperthyroxinemia

Hyperthyroxinemia is a condition in which the TSH values in the blood are within the normal reference range, but the thyroxine values are higher than the reference range. Based on the statistical evaluation of thyroid diagnostic results obtained at the Institute of Endocrinology in Prague in the period 2003 – 2022, which were determined using immunoanalytical systems from Roche Diagnostics GmbH, Germany operating in the ECLIA (electrochemiluminescence immunoassay) mode, we found a relatively high incidence of hyperthyroxinemia, the value of which was 6.7 % out of a total of 604792 determinations where TSH was normal. Hyperthyroxinemia in the TSH-FT4 system is often caused by administration of levothyroxine shortly before thyroid blood analysis. Hyperthyroxinemia is also caused by the presence of endogenous autoantibodies against T4, especially in patients with autoimmune thyroid disease. The frequency of occurrence of hyperthyroxinemia from other causes is not as serious.

Keywords: thyrotropin, thyroxine, free fraction of thyroxine, hypothyroxinemia, immunoanalysis

OBSAH

Úvod	29
Skřivan P, Sluková M.: Současné trendy v cereální technologii	30
Jiráček J. et al.: Perspektivy derivátů inzulinu s preferenčním působením v játrech	32
Novotná M., Jablonská E.: Mikrofluidní PCR s využitím přístroje Biomark X: Vysokokapacitní metoda analýzy (nejen) genové exprese	35
Bílek R.: Hyperthyroxinémie	39

CONTENT

Editorial	29
Skřivan P, Sluková M.: Current trends in cereal technology	30
Jiráček J. et al.: Perspectives of insulin derivatives with preferential action in the liver	32
Novotná M., Jablonská E.: Microfluidic PCR utilizing the Biomark X instrument: A high-throughput method for (not only) gene expression analysis	35
Bílek R.: Hyperthyroxinemia	39

REDAKČNÍ RADA

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

POKYNY PRO AUTORY

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

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

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

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

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

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

Novák Z: Disertační práce, VŠCHT Praha 2008.

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

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

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

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

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

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

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

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

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

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

Novák Z: Diploma thesis, UCT Prague 2008.

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

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

BIOPROSPECT

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

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

Zařazen do Seznamu recenzovaných neimpaktovaných periodik
vydáváných v ČR

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

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

Neprodejné – jen pro členy Biotechnologických společností.

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