

5. ročník (2020/2021)



# IBIS

Interaktivní Biologický Seminář

## 3. SADA

Autorské řešení

**MUNI | RECETOX**  
SCI

**MUNI** Ústav  
SCI experimentální  
biologie

## Průlet touto sadou aneb na co se můžete těšit?

1. Co kdyby neexistoval odpad? (Zuzana Nováková) .....	3
2. Kdopak by se lepku bál? (Hana Seličová) .....	9
3. Zachraň vodu, vykácej les!? (Jaroslav Rohel) .....	16
4. Praní špinavých proteinů (Daniel Pluskal, Martin Marek) .....	22
5. First aid (Jan Macek).....	34

Zuzana Nováková (e-mail: [zuzana.novakova@recetox.muni.cz](mailto:zuzana.novakova@recetox.muni.cz))

## 1. Co kdyby neexistoval odpad?

20 bodů

Jistě jste si často při procházce v přírodě řekli, že by to bylo krásné, kdyby naši krajinu (planetu) nemusely hyzdit černé skládky v lesních roklích či obaly od tatranek a plechovky od piva na hřebenech našich hor. Nebo se vám prostě jen nelíbí ty přetékající kontejnery na komunální odpad v ulici, kde bydlíte. Snad s každou lidskou činností je spjata produkce odpadu. A tak, v našem reálném světě, bohužel odpad existuje.

*Pozn.: kde jen můžete, uvádějte u vašich odpovědí zdroje, odkud jste čerpali.*

### 1. Celková produkce odpadů v EU se ročně pohybuje v řádu: [1 b]

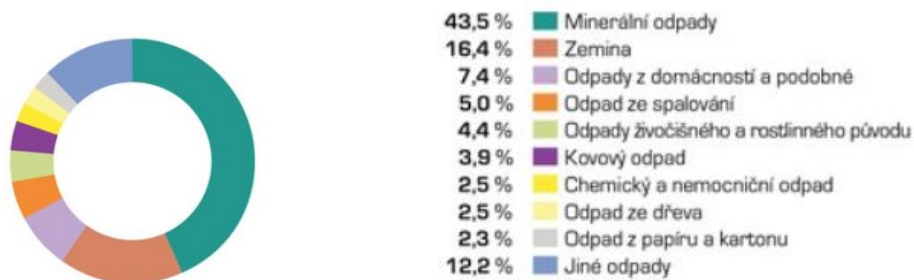
- a) stovek tun
- b) tisíců tun
- c) milionů tun
- d) **tisíců milionů tun ✓**

V roce 2018 to bylo 2 317 milionů tun (zdroj: [Eurostat](#)).

### 2. Kolik odpadu se ročně vyprodukuje v ČR v přepočtu na obyvatele? A jak si v této kategorii stojíme v porovnání s ostatními členskými státy? [2 b]

Dle údajů z roku 2018 připadá na jednoho obyvatele ČR 2,6 tun odpadu za rok, což představuje cca polovinu průměrné hodnoty (5,2 tun) pro celou Unii a řadí nás tak na zhruba 21. místo. Nejvyšší hodnoty vykazuje Finsko, Bulharsko a Estonsko, zatímco ty nejnižší patří např. Lotyšsku či Chorvatsku (zdroj: [Eurostat](#)).

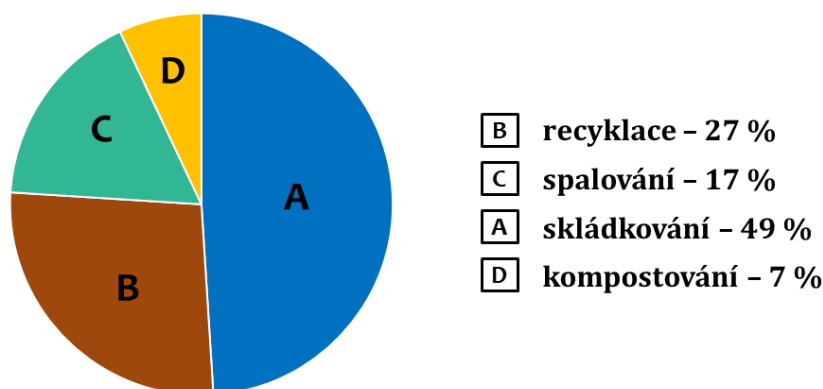
Ne všechna odvětví ale do těchto statistik přispívají stejně. Nejvíce odpadů je produkováno ve stavebnictví a při povrchové a důlní těžbě (minerální odpady a zemina), dále pak při výrobě a okolo 8 % odpadů pochází z domácností.



Ačkoli komunální odpad tvoří jen 8 %, je to část, která se týká našeho každodenního života nejvíce. Podíváme-li se blíže na odpad z domácností, každý ročně vyprodukujeme průměrně **desítky kg/stovky kg** (okolo 350 kg, zdroj: [ČSÚ](#)) /jednotky tun [vyberte množství; 0,5 b] komunálního odpadu. A jak jsou na tom Češi s tříděním takového množství komunálního odpadu? V porovnání s ostatními členskými státy EU jsme pod průměrem a na nejvíce třídící

stát, Německo, máme ještě co dotahovat. V Německu totiž zrecyklují nebo zkompostují až 68 % komunálního odpadu. A jak končí komunální odpad v Česku?

3. **Doplňte ke grafu správnou legendu:** [0,5 b]



Zdroj: [ČSÚ](#)

4. **Třídíte doma odpad? ANO/NE + Odůvodněte :)** [0 b; otázka položena čistě ze zvědavosti autorky]

Ano, odpad v naší domácnosti třídíme, a to včetně bioodpadu a hliníku. Při nedávném stěhování jsem do sběrného dvora zanesla sbírku starých baterek a plášť z kola. Do lékárny jsem taky odnesla balík dávno prošlých léků a v elektře vyměnila starou žárovku za novou. A tak jsem vlastně nedávno zjistila, jak jsou sběrná místa blízko, že jsou otevřená i během pandemie a že do nich, většinou zdarma, lze odnést opravdu hodně kategorií odpadu. Třídít mi připadá jednoduché a také smysluplné, protože naše zdroje nejsou neomezené. Dávat věci bokem a jednou za čas je prostě zanést o kousek jinam zas o tolik více času nezabere.

5. **Doplňte chybějící údaje.** [1 b]

Dle zákona \_\_\_\_\_ je odpad definován jako \_\_\_\_\_.

Jedná se o [Zákon č. 541/2020](#), Zákon o odpadech, který v § 4 definuje odpad jako každou movitou věc, které se osoba zbavuje, má úmysl nebo povinnost se jí zbavit. Díky různorodosti zdrojů a typů odpadů je také jejich legislativa velmi komplexní. Kromě výše uvedeného zákona se odpadového hospodářství týká také zákon o obalech (477/2001 Sb.), dvě vládní nařízení (111/2002 Sb. a 352/2014 Sb.) a nespočet vyhlášek (např. o hodnocení nebezpečných vlastností odpadů, o bateriích a akumulátorech, o biologicky

rozložitelných odpadech aj.). Do legislativy odpadů platné v ČR patří také mezinárodní smlouvy, např. [Basilejská úmluva](#) o kontrole pohybu nebezpečných odpadů přes hranice států a o jejich zneškodňování. Speciální [úmluva](#) je věnována také radioaktivnímu odpadu.

Nakládání s odpady a jejich likvidace má důsledky nejen pro životní prostředí, ale i pro nás představují odpady ohromnou ztrátu materiálu a energie. Mnoho lidí se však na odpad dívá jako na zdroj zisku. Že odpad stále představuje komoditu, kterou lze využít, a co víc, se kterou lze obchodovat, dokládá mezinárodní trh s elektronickým odpadem (*e-waste*). Tento odpad je často vyvážen/prodáván do rozvojových zemí, kde sice dochází ke zpětné recyklaci např. drahých kovů, ale ...

6. Vyjmenujte alespoň 3 negativní dopady této činnosti. [2 b]

Nejedná se o zrovna ukázkový příklad recyklace, zejména když přihlédneme k životním podmínkám lidí, kteří se takto živí, ke zdravotním rizikům, kterým se při práci vystavují a samozřejmě k nezanedbatelné ekologické stopě, která je nutně spjata s transportem takového odpadu na velké vzdálenosti.

Významným negativem je případný vznik [zplodin](#), které vznikají při likvidaci elektroniky a které mohou ohrozit jak lidské zdraví, tak kontaminovat prostředí. Konkrétně při zpracování (spalování) těchto materiálů dochází například ke vzniku a uvolnění dioxinů, PCBs či PAHs. Toxicita těchto látek je známá. Při akutní expozici mohou poškozovat trávicí, dýchací či nervovou soustavu, při chronické expozici mohou působit jako karcinogeny či endokrinní disruptory a přispívat tak ke vzniku rakoviny či narušení hormonální rovnováhy. Těžké kovy obsažené v tomto odpadu mohou také unikat do půdy a kontaminace se může šířit do vody, zemědělských plodin a potravních řetězců.

Dalším příkladem činnosti, kdy lidé nahlízejí na odpad zároveň jako na zdroj, je využití gastroodpadu. Jedná se např. o odpadní produkty potravinářské výroby (např. pivovarské mláto), odpad ze stravovacích zařízení či již neprodejné potraviny v supermarketech. Zajímavým projektem v této oblasti je výzkum využití zmíněného gastroodpadu pro bráněnky.

7. Zjistěte, kdo nebo co jsou bráněnky a co s gastroodpadem dělají. Na co by se výsledný produkt dal využít/na co se již využívá? [2 b]

Bráněnky (*Hermetia illucens*) jsou subtropické mouchy. Jejich larvy se využívají ke konverzi gastroodpadu např. na nutričně cenné proteiny a tuky. Jejich chov je nenáročný. Larvy bráněnek jsou velmi nenasytčné a dokáží během svého vývoje zredukovat objem odpadu o desítky procent (60-80 %). Zároveň rychle nabírají na hmotnosti (až 6000x zvýší svou hmotnost za 15 dní), aby se mohly zakuklit. Larvy před stádiem zakuklení lze *sklízet* a po usušení mohou být rozemlety na moučku. Z takto připravené hmyzí moučky můžete upéct sušenky nebo müsli tyčinky. Bohužel, použití pro potraviny pro člověka zatím v ČR není schválené, ale některá zvířata se již takto krmit můžou. Z hmyzí moučky se vyrábí např. [krmivo pro psy či ryby](#) a do budoucna se zvyšuje schválení těchto produktů i pro hospodářská zvířata.

Oba výše uvedené příklady mají jedno společné: odpad se v nich stává zdrojem, z něž můžeme znovu něco vyrobit a získat hodnotu. Kruh se uzavírá. Tímto bych vám ráda představila tzv. cirkulární ekonomiku (nebo též oběhové hospodářství). Že vám tento koncept zní povědomě? Divila bych se, kdyby ne. Jen si vzpomeňte na to, jak fungují toky látek v ekosystémech. Příroda je mistrem cirkulární ekonomiky.

8. Vyberte, co je pro tento koncept typické. [1,5 b]

- **Využívání obnovitelných zdrojů energie ✓**
- **Proudění materiálů v uzavřených cyklech ✓**
- **Použití technologií a designu, který prodlužuje životnost ✓**
- **Vyšší produktivita využívaných zdrojů ✓**
- **Pronájem výrobků ✓**
- **Je zakotven v legislativě EU ✓**

Správnou odpovědí jsou všechny možnosti. Cirkulární ekonomika cílí na efektivnější využití zdrojů a v případě zdrojů energie upřednostňuje ty obnovitelné. Životnost výrobku by měla být zohledněna už při jeho designu, aby výrobek ideálně sloužil co nejdéle a klidně i více lidem (pronájem). A že se nejedná jen o zajímavý koncept skupinky nadšenců, dokládá i skutečnost, že cirkulární ekonomika ([The circular economy action plan](#)) je jedním z kroků Zelené dohody pro Evropu (European Green Deal) a je tedy zakotvena a postupně implementována v právu EU i členských států.

9. Zkuste najít nějakou firmu nebo produkt, kde se tento koncept využívá a popište jak. [2 b]

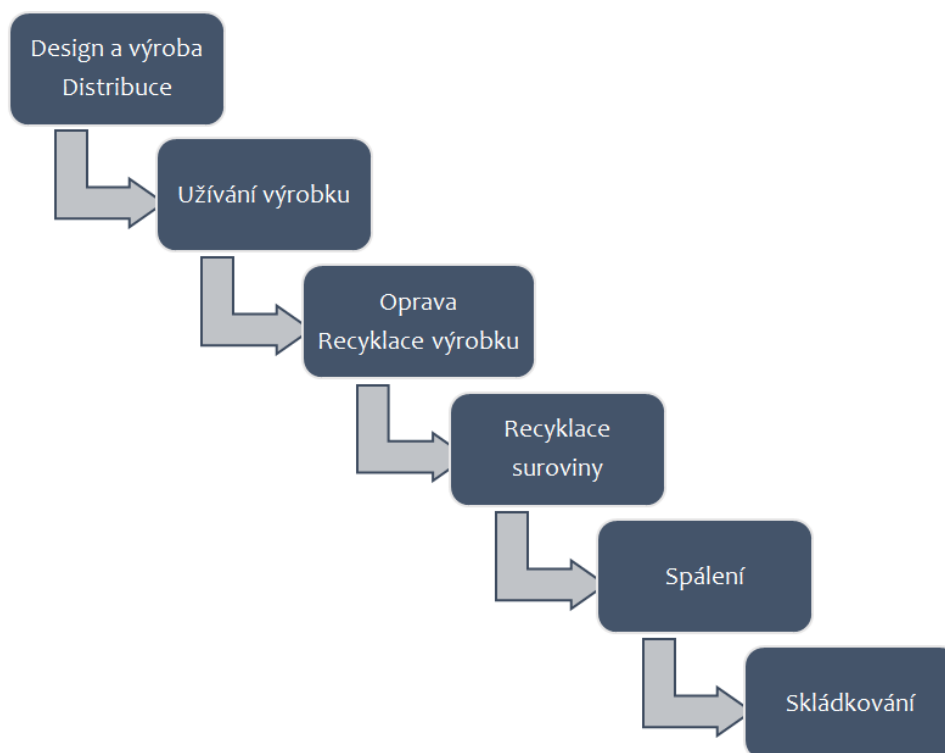
[Timbuk2](#) – americký výrobce batohů, který kromě opravy nabízí i vrácení již nepoužívaných výrobků pro darování dále nebo pro recyklaci materiálů.

Dále např. firmy Nike či Dell, které vykazují vysoký podíl recyklovaných surovin ve svých výrobcích a pomocí analýzy životního cyklu (LCA) se snaží snižovat jejich negativní dopad na ŽP. Zajímavým počinem je také zálohovaná PET láhev společnosti [Mattoni](#).

10. Zní to vlastně pohádkově. Napadly by vás nějaké překážky, které stojí cirkulární ekonomice v cestě? Proč tak ideální věc ještě nefunguje všude? [3 b]

- kulturní: spotřebitelé nemají zájem o ekologicky odpovědné produkty; ačkoli nemůžeme zcela zobecňovat a jistě se mezi vámi najdou výjimky, do jisté míry jsou Češi tradicionalisté
- tržní: vysoké náklady při přechodu na cirkulární podnikání
- technologické: špatná dostupnost nových technologií a jejich vysoké pořizovací náklady
- regulatorní: výrobní postupy i samotný prodej či nakládání s výrobkem, to vše může být svázáno s nějakým typem regulace

Abychom uzavřeli kruh, vraťme se na závěr této úlohu k jejímu úvodu. Množství odpadu, které produkujeme, je enormní a stále se zvyšuje. Odpadu se tedy jen tak nezbavíme. Odpad, který už vznikne, můžeme recyklovat a znova využívat. Snad nejhorší variantou, jak s odpadem naložit, je skládkování. Ukázali jsme si, že existují možnosti, jak odpad znovu využívat a vnímat jako zdroj.



Další cestou je pak odpad vůbec nevytvářet a výrobky třeba opravovat a hledat pro ně další využití, aby se ani odpadem nestaly. Sympatickou možností, jak se dá taky k výrobkům a vzniku odpadů přistupovat, je nevlastnění věcí, tedy jejich sdílení. Jeden výrobek pak slouží co nejvíce lidem. Krásným příkladem jsou u nás v Brně sdílená Rekola.

11. Jaké možnosti sdílení věcí jsou dostupné v místě, kde žijete? Uveďte příklady firem, výrobců, věcí či institucí, které obdobným způsobem snižují množství vlastněných věcí. Pokud některé z nich sami využíváte, podělte se o své zkušenosti. :) [4,5 b]

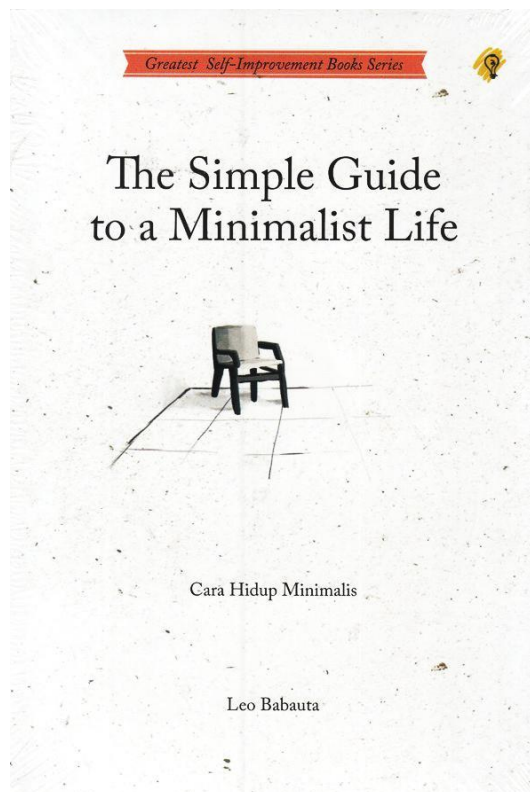
Může se jednat např. o:

- knihovny, půjčovny [náradí](#), sportovního vybavení, pronájem klavírů, společné [dílny](#), [kanceláře](#) aj.
- sdílení dopravních prostředků: [Rekola](#), [NextBike](#), [elektrické koloběžky](#), [Auto napůl](#), [AJO](#), [Car4way](#), přepravní služba [Uber](#)
- bazary (kamenné i [online](#)), second-handy, knihobudky, antikvariáty aj. (Nejedná se sice o sdílení, spíš o přeprodávání, ale snižuje to množství odpadu tím, že věci mohou déle kolovat.)
- sdílení nevyužívaného bydlení pro turisty ([AirBnB](#))
- nevyhazování jídla: z restaurací (aplikace [Nesnězeno](#)), vznik potravinových bank a food-boxů

Nemalý podíl na rozvoji výše zmíněných služeb má **digitalizace**, která výrazně zefektivňuje sdílení! Například na Facebooku dnes najdete skupinu na sdílení snad čehokoli.

Autorka úlohy osobně nejraději využívá služeb sdílení knih, které podle jejího názoru mají kolovat a ne ležet na policičkách. Občas si půjčí nějaké to sportovní vybavení. Zkušenost má také s AJO autíčky, která, kdyby byla využívána víc, by mohla pomoci s nedostatkem parkovacích míst ve městech a za přijatelnou cenu zbavují uživatele starostí spojených s vlastněním auta.

Pokud se vám líbí mít trochu méně věcí, prozkoumejte směr zvaný [minimalismus](#).



Hana Seličová (e-mail: [h.selicova@seznam.cz](mailto:h.selicova@seznam.cz))

## 2. Kdopak by se lepku bál?

20 bodů

### Co je to vlastně lepek a proč by nás měl zajímat?

Lepek, který v cizojazyčné nebo odborné literatuře můžeme najít také pod názvem gluten, je obecně označení pro skupinu složitých glykoproteinů (prolaminů). Tyto látky poté můžeme v různém zastoupení a složení nalézt společně se škroby ve vnitřním živném pletivu semen (v tzv. endospermu) některých rostlin z čeledi lipnicovitých, např. v pšenici, ječmeni, žitu a ovsu. Jedná se o hlavní zásobní bílkovinu obilných zrn. Zastoupení složitých glykoproteinů se pak liší u jednotlivých druhů obilovin kvůli jejich rozdílným genotypům, podmínkám růstu a technologickým způsobům zpracování. Lepek jako takový pak těstu z nich zajišťuje pružnost a výslednému pečivu nadýchanost. Z toho vyplývá, že čím více lepku těsto obsahuje, tím lepší bude vzniklý produkt vlastnostmi i chutí. Pšeničný, ječný a žitný lepek budou tedy pečivu poskytovat konkrétní vlastnosti charakteristické právě pro daný druh obilniny, z něž bylo vyrobeno.

1. V první otázce se nejprve trochu zahřejeme a zorientujeme v problematice lepku. Jak již bylo řečeno, lepek se liší svým složením u jednotlivých obilnin. Napište k níže vypsáním obilovinám názvy v nich přítomných glykoproteinů tvořících lepek. Každá mezera reprezentuje jeden prolamin. Napište, která z těchto obilovin obsahuje nejvíce lepku a kolik procent z jejího bílkovinného obsahu tento protein představuje. [2 b]

Pšenice = gliadin + glutenin

Ječmen = hordein

Žito = secalin

Oves = avenin

S lepkem se pojí velké množství moderních výživových směrů, které jej radí z jídelníčku pro jistotu úplně vyřadit, aby člověk dosáhl kýženého úbytku hmotnosti a ručička na váze se posunula směrem doleva. Automaticky pak vzniká názor, že lepek je něco, co nám škodí a že se jeho vyřazením stáváme zdravějšími a krásnějšími. Není tomu ale tak. Co si lidé na dobrovolné bezlepkové dietě s cílem zhubnout neuvědomují, je, jak tato dieta v principu funguje a díky čemu vlastně hubnou.

2. Na jakém principu funguje hubnutí pomocí vyřazení lepku ze stravy? Zkuste porovnat klasický tukový rohlík s přirozeně bezlepkovým rýžovým nesoleným chlebíčkem Sondey z hlediska kalorické hodnoty (myslete přitom také na to, kolik kusů jednotlivých příloh je potřeba k nasycení, můžete si to klidně zkusit sami na sobě). Je tento způsob hubnutí zdravý? Na co by lidé dobrovolně vyřazující lepek ze své stravy měli myslet? [3 b]



V principu „dobrovolní bezlepkoví dietáři“ vynechají pečivo, klasicky bílé tukové pečivo a nahradí ho zdravější variantou, nejčastěji asi ve formě rýžových chlebíčků. Tady se na chvíli zastavíme a trošku si započítáme. Běžný tukový rohlík má cca 50 g a jeho energetická hodnota je 760 kJ (182 kcal). Většinou člověk na svačinu sní jeden nebo dva takovéto rohlíky, čímž už se dostáváme na hodnotu zhruba 1520 kJ (364 kcal). Po nahrazení rohlíků rýžovými chlebíčky, které mají na 100 g stejnou energetickou hodnotu jako právě zmiňovaný tukový rohlík, dochází ale k tomu pocitu „plného břicha“ už zhruba při snědení 4 kusů (1 kus má cca 7 g). Stejně tak k nasycení tímto pufovaným lehkým výrobkem dochází už zhruba u 3-4 kusů, což je dejme tomu 28 g. Už tady vám musí být nad slunce jasné, kam tím mířím. Na svačině složené z rýžových chlebíčků (teď neberu v potaz kalorickou hodnotu šunky nebo pomazánky, kterou si k tomuto druhu „pečiva“ dáme 😊) dostaneme do těla energii odpovídající zhruba 434 kJ (104 kcal). Když to porovnáme s rohlíkovou svačinou, vidíme, že tímto nahrazením ušetříme 78 kcal v případě svačiny s jedním rohlíkem. Toto číslo se zdá jako malé. Při dosahování kalorického deficitu se ale počítá každá kalorie, o kterou svůj příjem snížíme. V případě nahrazení pečiva zeleninou bude samozřejmě kalorický schodek ještě větší. Toto je princip, jakým funguje hubnutí pomocí bezlepkové diety – tedy pomocí **spontánního dosažení kalorického deficitu** <sup>4</sup>.

rohlík tukový				
Množství	50 x 1 g	Zapsat potravinu do jídelníčku		
Energetická hodnota	Bílkoviny	Sacharidy	Tuky	Vláknina
601 kJ	4 g	28 g	2 g	1 g

rýžový chlebíček nesolený Sondey (Sondey)				
Množství	4 x kus (7 g)	Zapsat potravinu do jídelníčku		
Energetická hodnota	Bílkoviny	Sacharidy	Tuky	Vláknina
434 kJ	2 g	21 g	0,99 g	-

Důležité je si ale uvědomit, že lepek je směs bílkovin a bílkoviny jsou při hubnutí zásadním faktorem. Proto by si lidé, kteří se rozhodnou hubnout touto cestou, měli uvědomit, že musí tyto bílkoviny do těla dostat jinou formou, ať už jde o maso, mléčné výrobky, vejce nebo třeba luštěniny. V případě, že lidé lepek vynechají a myslí na doplnění bílkovin a zároveň splňují pravidla zdravé výživy (jíst co nejméně průmyslově zpracovaných potravin, jíst hodně zeleniny atd.), může být tento způsob hubnutí považován za **zdravý**, protože tělo nestrádá žádnou živinou.

Každopádně zdravější variantou je samozřejmě pestrá strava zahrnující různé druhy potravin obsahující všechny živiny, tedy i lepek, protože při cíleném vynechání lepku ze stravy může dojít k vypěstování alergie nebo intolerance lepku po opětovném navrácení do stravy.

### **Onemocnění způsobená přítomností lepku ve stravě**

Druhou stranou mince jsou onemocnění, při kterých člověk musí lepek ze své stravy vyřadit chtě nechtě. Mezi ně patří například celiakie, alergie na lepek nebo neceliakální senzitivita na lepek. My se tady postupně na všechna z nich podíváme.

**Celiakie** je chronické onemocnění sliznice tenkého střeva, které je způsobené přecitlivělostí právě na námi zmiňovaný lepek. Celiakie je celoživotní diagnóza, jejímž jediným možným řešením k „uzdravení“ pacienta – rozuměj k dosažení stavu, kdy pacientovo tělo nevykazuje žádné příznaky ani potíže, nikoliv vyléčení celiakie – je doživotní bezlepková dieta. V dřívějších dobách tato diagnóza byla něčím šíleným, hlavně z důvodu nedostatku bezlepkových potravin na trhu, dnes už je ale situace naštěstí jiná a bezlepkový chléb se dá mimo všudypřítomné velké supermarkety sehnat i v některých lépe vybavených obchodech v menších městech.



3. Právě kvůli těmto onemocněním je lepek řazen mezi alergeny, které mohou ohrozit konzumenta. Od kterého roku je zavedena v platnost povinnost provozovatele poskytnout spotřebiteli informace o alergenních látkách v pokrmech, která se vztahuje na všechny typy zařízení společného stravování (např. restaurace, bufety, jídelny, ...)? [1 b]

Jde o nařízení (EU) č. 1169/2011, platné od 13. 12. 2014.<sup>5</sup>

4. Představte si situaci, že jste v restauraci a držíte v ruce jídelní lístek, ze kterého si chcete vybrat oběd. Ale zároveň máte diagnostikovanou celiakii, takže je pro vás tento výběr značně omezen. Po jakém číselném označení alergenu se budete dívat a co všechno toto číslo zahrnuje? Musí alergeny být vypsány i u nápojů? [3 b]

Musíme se dívat po alergenu č. 1, který zahrnuje obiloviny obsahující lepek, konkrétně tyto: pšenici, žito, ječmen, oves, špaldu, kamut nebo jejich hybridní odrůdy.

Ano, alergeny musí být vypsány i u nápojů. Některé nápoje obsahují různé alergeny, když se podíváme konkrétně na lepek, tak ten je obsažen např. v pivu nebo v některých druzích nealkoholických sladových nápojů. Mimo lepek je alergenem například mléko, které se v nápojích také často vyskytuje.

5. Musí údaje o alergenech být uvedeny v jídelním lístku? Pokud ano, co je třeba do jídelního lístku doplnit? Pokud ne, jak jinak se k této informaci můžete dostat? [3 b]

Tento údaj nemusí podle zákona být uveden v jídelním lístku. Restaurace (resp. provozovatel) musí tuto informaci zákazníkovi být schopen poskytnout. Je ale více možností, jak ji předat. Může to být právě formou jídelního lístku. V tom případě je potřeba uvést ke konkrétním pokrmům čísla alergenů, které daný pokrm obsahuje, také ale tento jídelní lístek musí být rozšířen o příslušnou legendu – seznam alergenů a jejich čísel.

Další možností je vypsání alergenů do jídelního lístku slovně, v tomto případě legenda není třeba. Je ale potřeba alergeny vypsát za slovo „obsahuje“.

Dále je možnost mít informace o alergenech u obsluhy na vyžádání (většinou jde o jeden jídelní lístek rozšířený právě o tyto informace). Jídelní zařízení ale o faktu, že jsou alergeny na vyžádání u obsluhy, musí konzumenta informovat jasně a viditelně, např. cedulí u vstupu nebo vepsáním do jídelního lístku.

Poslední variantou je psaná informace prostřednictvím zařízení pro vizuální komunikaci (např. v informacích na zařízení pro objednávání jídel nebo pití – tablety nebo objednávací pupty).

Problematicke celiakie ve spojení se stravováním mimo dům už jsme se pověnovali, teď se pojďme zaměřit více na lékařskou stránku tohoto autoimunitního onemocnění. Celiakie je sice celoživotní onemocnění, není ale pravidlem, že je diagnostikována už v brzkém dětském věku. Většinou pacienta s touto poruchou zavedou k lékaři až obtíže, které se s neléčenou celiakií pojí, mezi které klasicky patří zažívací obtíže, jako jsou nevolnosti po jídle, vleklé průjmy či zvracení. Zhoršené trávení a příjem živin (dyspepsie a malabsorpce) vedou ke komplikacím ve formě poruch metabolismu. Další komplikace jsou způsobeny poškozením tkání a orgánů autoimunitní reakcí. To vede ke stavu chronického zánětu, který spolu s poruchou metabolismu vede k ovlivnění stavu imunitních molekul, růstových faktorů, hormonů a neurotransmiterů v celém organismu. Toto vše se projevuje jako ztráta hmotnosti, únava, rozmrzelost, bledá kůže, lámavé nehty a vlasy, u dětí často poruchy růstu, anémie a defekty zubní skloviny.

6. Jakým kódem se označuje diagnóza celiakie a k čemu může vést pozdní nebo žádná diagnóza tohoto onemocnění u pacienta jím trpícího? Jaké jsou nejčastější přidružená onemocnění ve spojení s celiakií? [2 b]

Onemocnění má kód **K90.0**, spadá pod střevní malabsorpce, které nesou kód K90. Neléčená celiakie zvyšuje nebezpečí onemocnění tzv. non-Hodgkinskými lymfomy (agresivními formami rakoviny lymfatické tkáně), ale také rakovinou střeva.

U 5-10 % pacientů se zároveň vyskytuje cukrovka, onemocnění štítné žlázy či dermatitida. Lidé s Downovým syndromem mají vyšší sklony k celiakii.

## SEZNAM ALERGENŮ

publikovaný ve směrnici 2000/89 ES od 13.12.2014 směrnici 1169/2011 EU



Každé onemocnění má svůj původ – ať už jde o původ genetický nebo původ vnější. Celiakie se vyvine v kombinaci obou faktorů. Pacienti s celiakií mají dědičné genetické predispozice dané alelami HLA-DQ2 a HLA-DQ8, které jsou přítomny u velké většiny z nich. K rozvinutí obtíží a „rozběhnutí“ nemoci může přispět např. zvýšený příjem lepku ve stravě či virová infekce, která způsobí porušení tight-junctions (těsných mezibuněčných spojů) a vyšší propustnost střevní membrány. Kvůli tomuto dochází ke vstupu špatně štěpitelných glutenových peptidů do vazivové vrstvy sliznice, které tam následně indukují zánětlivou reakci.

Řekli jsme si, jakým způsobem se celiakie projevuje a indukuje. Neléčená celiakie ale může způsobovat různě rozsáhlé poškození střevní sliznice – konkrétně vilózní atrofii, což je v podstatě destrukce střevních klků způsobující malabsorpci živin, střevo neléčeného celiaka je pak v porovnání se střevem zdravého člověka prakticky vyhlazené (viz obrázek). K získání vzorku střevní sliznice je potřeba provést invazivní biopsii duodenální sliznice, při které se odebere kousek sliznice z dvanáctníku tenkého střeva.




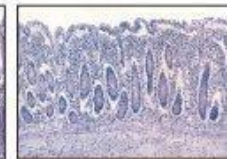
7. Pomocí jaké škály definujeme poškození střevní sliznice? Jaké jsou další testy potřebné pro diagnostiku celiakie? Vypište alespoň 3 parametry stanovované z krve pacienta. [3 b]



Používáme Marshovu klasifikaci, která může dosahovat stupně 0-3, přičemž stupeň 3 se ještě dále dělí na podskupinu A, B a C podle stupně poškození sliznice.

Pro klasifikaci histologického nálezu při celiakii se používá Marshova klasifikace (typ postižení):

- *Marsh 0*: histologicky normální sliznice (pacient má celiakii, ale drží úspěšnou dietu)
- *Marsh 1*: (infiltrativní typ): přes 40 intraepiteliálních lymfocytů na 100 enterocytů, normální krypty, klky, není výrazná celulizace stromatu
- *Marsh 2*: (hyperplastický typ): intraepiteliální lymfocyty, hyperplazie krypt, klky normální, lymfocytární infiltrace stromatu
- *Marsh 3*: (destruktivní typ): intraepiteliální lymfocyty, hyperplazie krypt, klky atrofické, lymfocytární infiltrace stromatu
  - *Marsh 3a*: mírná atrofie klků
  - *Marsh 3b*: těžká atrofie klků
  - *Marsh 3c*: úplná atrofie klků, hladká sliznice

				
	<b>Normal/Marsh 0</b>	<b>Marsh 1</b>	<b>Marsh 2</b>	<b>Marsh 3</b>
<i>IEL/100 enterocytes</i>	<30	>30	>30	>30
<i>Crypt Hyperplasia</i>	<i>Normal</i>	<i>Normal</i>	<i>Increased</i>	<i>Increased</i>
<i>Villous Atrophy</i>	<i>Normal</i>	<i>Normal</i>	<i>Normal</i>	<i>Mild (3a)</i> <i>Marked (3b)</i> <i>Complete (3c)</i>

Pro diagnostiku celiakie jsou také stanovované sérové markery, které by měly předcházet podstoupení duodenální biopsie. Mezi tyto markery řadíme průkaz IgA proti tkáňové transglutamináze (tTG), proti gliadinu a také proti endomysiu (anti-endomysial antibodies, EMA) nebo také proti deamidovanému gliadinu<sup>6</sup>. V případě pacienta se sníženou tvorbou IgA se stanovují hodnoty IgG<sup>7</sup>.

Celiakie není jediným onemocněním, které souvisí s autoimunitní patogenezí a s lepem. Patří sem také například **Duhringova herpetiformní dermatitida**, která se kromě běžných příznaků neléčené celiakie projevuje také bolestivými puchýři na kůži po sebemenším vystavení lepku, a **glutenová ataxie**, která při dlouhodobé expozici lepku způsobuje neuropatie, které se projevují jako poruchy citlivosti a koordinace pohybu, především chůze. Po vyřazení lepku ze stravy dochází k zastavení neuropatických procesů, ke zlepšení stavu už ale dojít nemůže.

Lepek nemusí indukovat pouze reakci autoimunitní, ale také reakci alergickou, jak je tomu například u **alergie na pšenici**. Ta je definována jako obranná imunologická reakce zprostředkovaná specifickými IgE i non-IgE protilátkami na složky pšeničného lepku.

#### 8. Jaké části těla může postihovat alergie na pšenici, resp. na jaké alergie se dále alergie na pšenici dělí? [2 b]

V závislosti na cestě vstupu alergenu do organismu a na ostatních imunologických mechanismech se alergie na pšenici dále dělí na: potravinovou alergii, respirační alergii, kožní formu alergie (kontaktní urtikarie a WDEIA = wheat dependent exercise induced anaphylaxis, anafylaxe na pšenici vyvolaná fyzickou aktivitou).

Klasická potravinová alergie na pšenici může postihovat gastrointestinální trakt, respirační trakt či kůži – tzn. projevy se mohou ukázat na všech popsanych částech těla.

K respirační pšeničné alergii patří profesionální astma pekařů a alergická rýma.

Kožními formami alergie na pšenici jsou kontaktní kopřivka a WDEIA. WDEIA je onemocnění, které vyžaduje k rozvoji symptomů dvě podmínky: jedinec musí konzumovat jídlo obsahující pšenici a poté provádět aerobní cvičení. Samotná pšeničná potrava či samotné cvičení bez předchozí pšeničné stravy nevyvolávají obtíže. Kombinace obojího může vést až k rozvoji anafylaktického šoku.

Poslední kategorií onemocnění, která indukují přítomnost lepku ve stravě, je zvýšená citlivost na lepek, která nemá ani alergický, ani autoimunitní charakter – neceliakální glutenová senzitivita (NCGS). Jde o diagnózu, při které je stejně jako u celiakie nutno dodržovat celoživotní bezlepkovou dietu. Příznaky jsou stejné jako u celiakie.

#### 9. Jak probíhá diagnostika neceliakální glutenové senzitivity a jak poznáme, že nejde o celiakii? [1 b]

Diagnostika neceliakální glutenové senzitivity probíhá stejně jako diagnostika celiakie – nejprve serologické testy na IgA proti gliadinu, endomysiu a tkáňové

transglutamináze. Při neustávajících potížích po glutenovém zátěžovém testu následuje duodenální biopsie.

Rozdíl je zde v tom, že u NCGS je pozorován normální bioptický nález odpovídající střevu zdravého člověka, stejně tak jsou krevní testy negativní na protilátky EMA i jiným markerům charakteristickým pro celiakii. Jediné, co se může prokázat pozitivně, jsou IgA protilátky proti gliadinu, které jsou ale potvrzeny pouze u zhruba 50 % pacientů trpících NCGS. Zásadní je zde fakt, že po nasazení bezlepkové diety všechny obtíže vymizí.

#### ZDROJE:

- (1) Biesiekierski, J. R. What Is Gluten? *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2017, 32 (S1), 78–81. <https://doi.org/10.1111/jgh.13703>.
- (2) Co je vlastně lepek | KLEIS. <https://www.kleis.cz/clanky/38-co-je-vlastne-lepek> (accessed Dec 26, 2020).
- (3) Lepek. *Wikipedie*; 2020.
- (4) Vyřadili jste pečivo s lepem oprávněně? <https://aktin.cz/vyradili-jste-pecivo-s-lepem-opravnene> (accessed Dec 26, 2020).
- (5) inspekce, all: S. zemědělská a potravinářská. Povinnost provozovatelů zařízení společného stravování poskytovat informace o alergenních složkách. <https://www.szpi.gov.cz/clanek/povinnost-provozovateleu-zarizeni-spolecneho-stravovani-poskytovat-informace-o-alergennich-slozkach.aspx> (accessed Dec 29, 2020).
- (6) Celiakie – Diagnóza. <http://www.celiakie.patologie.cz/diagnoza.html> (accessed Dec 29, 2020).
- (7) Celiakie. *Wikipedie*; 2020.

Jaroslav Rohel (e-mail: [jarek.rohel@gmail.com](mailto:jarek.rohel@gmail.com))

### 3. Zachraň vodu, vykácej les!?

20 bodů

Na úvod začneme příkladem na zamyšlení. Představte si situaci: Chcete pomoci krajině zadržovat vodu a rozhodnete se vysadit stromy na mez mezi poli. Vytvoříte tak remízku uprostřed vyprahlých polí, který by mohl plnit funkci jakési oázy – zadržovat vodu, vytvářet stín a poskytnout útočiště mnoha živočichům. Argumentuje s vámi člověk, který se vás ptá, nač chcete sázet strom, který odpaří mnohem více vody a tím napomáhá k vysušování krajiny. Pokud vám jde o vodu, proč nenecháte jen travnatý pás či jedno velké pole? Kdo z vás má pravdu?

1. Celá situace není nijak jednoduchá. Přesto se však pokuste nad danou problematikou zamyslet a do několika vět shrnout důvody pro a proti oběma tvrzením. Také se zamyslete nad důvody, proč tato problematika není úplně jednoduchá. [2 b]

Uznávány budou snahy o zamyšlení nad problematikou. Níže pro příklad uveden nástřel několika takových zkrácených poznatků či myšlenek:

Správnou odpovědí by bylo, že pravdu mají obě strany. Jeden vzrostlý strom je za pěkného letního dne schopný odpařit stovky litrů vody. Množství vody odpařené z celého lesa je tak jen velmi těžko představitelné. Pokud bychom se lesa zbavili, zbavili bychom se tím i takto neúměrně vysokého odparu vody. Odpar z louky či z polí bývá zpravidla značně nižší. Měli bychom tak získat více vody. Zároveň je ale známa schopnost lesů zadržovat vodu (více viz dále).

Pokud bychom plánovali mezi poli založit vlhkou oázu, je nutné si uvědomit, že tato myšlenka není vždy proveditelná – vzduch nad okolními poli se za slunečného dne ohřívá na značnou teplotu, stoupá výše (teplejší vzduch je lehčí) a nasává tak vzduch z okolí nad pole, tedy i z naší oázy, kterou takto vysušuje.

Jedním z důvodů, proč situace podobné té popsané v zadání jsou mnohdy případem sporů, je, že vždy záleží na podmínkách konkrétní lokality, a zpravidla tak nelze predikovat obecně platné závěry.

Za vhodné považuji zdůraznit, že rozhodně ne vždy je všude vhodné sázet stromy, ač se to poslední dobou stává módním trendem – někde může vysazení stromů opravdu způsobit vysoušení krajiny! Zároveň nepromyšlenou výsadbou stromů či keřů můžeme zničit jiné vzácné biotopy, kterých v naší krajině příliš není, a ohrozit tak jiné druhy!

Než se však vrhneme dále, bylo by vhodné ujasnit si, co znamenají některé pojmy.

2. Co je to transpirace, evaporace a evapotranspirace? [2 b]

Transpirace je výdej vody prostřednictvím vodní páry vegetací. (Pozor, nepatří sem obecně všechny typy výdeje vody rostlinou. Jiným typem výdeje vody rostlinou může být např. gutace.)

Evaporace je vypařování vody z povrchů (jako např. z půdy, vodní hladiny či mokrých listů po dešti).

Evapotranspirace zahrnuje celkový výpar z daného území, je součtem transpirace a evaporace.

Na evapotranspiraci existují dva hlavní pohledy. S tím souvisejí dva přístupy k hospodaření s vodou, které jsou mnohdy bouřlivě diskutovány. Oba přístupy bych vám chtěl ve zkratce představit.

a) minimalizovat výpar a efektivně využít každou kapku – jedná se o metodu šetření s vodou a její neoptimálnější využití. Evapotranspirace je považována za zbytečné plýtvání vodou, které je potřeba omezit. Stromy spotřebují obrovské množství vody. Pokud bychom se jich zbavili, budeme moci vodu, kterou by vydaly transpirací, využít účelněji. Třeba pro zavlažování plodin (např. kapénkovou závlahou) upravených tak, aby spotřebovaly co nejméně vody a nakládaly s ní co nejefektivněji. V rámci snížení evapotranspirace je nejlepší udržovat pole po sklizni holá.

b) maximalizovat pokrytí vegetací – od předchozího řešení se radikálně liší v pohledu na transpiraci, která je místo plýtvání považována spíše za naši spásu. Představuje řešení založené na snížení maximálních teplot povrchu Země odpařováním vody prostřednictvím vegetace. Převládá snaha redukovat jakoukoliv volnou půdu a snažit se, aby byla neustále pokryta vegetací.

### 3. Vegetace má významný vliv na každodenní počasí. Do odpovědi v několika větách rozveďte, jak ovlivňuje vegetace počasí, respektive jaký má dopad na klima. [2 b]

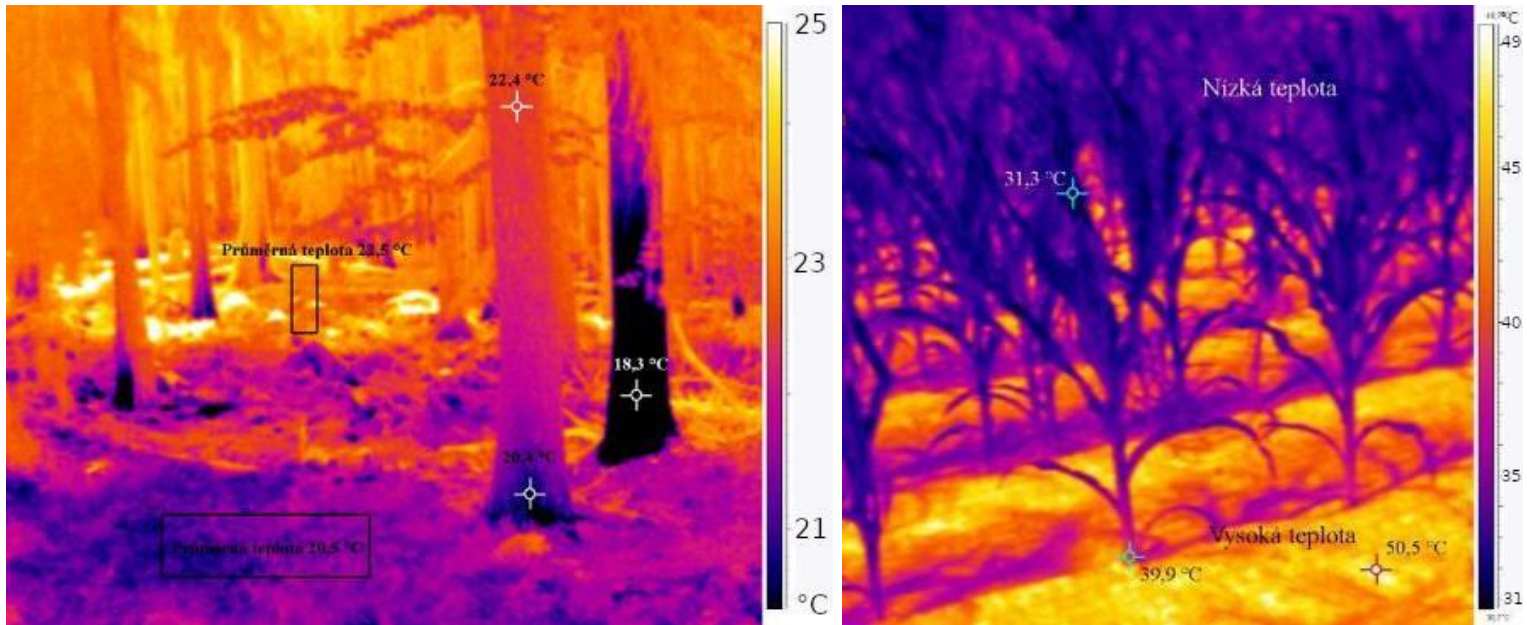
Obecně zajišťuje stabilitu klimatu.

Vyrovňování teploty: Voda, která se za dne vypařuje, spotřebovává teplo a tím chladí. Naopak s kondenzací teplo zase vrací zpět. Nepřítomnost dostatečného množství vody, která by vyrovnávala teplotu, je tak i důvodem, proč na poušti v noci bývají teploty okolo bodu mrazu a ve dne nesnesitelné vedro.

Stabilita tlaku: Plochy bez vegetace, které často bývají tmavé (např. zorané pole, zástavba či silnice) se velmi rychle ohřívají. Vzduch nad nimi je teplý, a tak stoupá výše. Nad tyto nahřáté plochy je nasáván vzduch z okolí, který se následně také ohřívá a stoupá výše. To má za následek vznik silných vzdušných proudů. Co takový vzdušný vír dokáže napáchat, asi netřeba představovat.

Jak velký může být teplotní rozdíl mezi lesem a polem si můžeme demonstrovat na následujících fotografiích z termokamery.

4. Popište obrázky níže a s jejich pomocí vysvětlete a srovnajte proudění vzduchu ve vzrostlém lese a na poli a vliv proudění vzduchu na odpar vody. Pro účely této úlohy předpokládejte, že obě fotografie byly vytvořeny v podobný čas během horkého slunného dne. [3 b]



Obr. 1 a 2: Převzato z POKORNÝ, Jan a Petra HESSLEROVÁ. Vliv vegetace na oběh vody – kontroverzní názory. In: Rožnovský, J., Litschmann, T. (eds): Hospodaření s vodou v krajině. Třeboň 21. –22. 6. 2018, ISBN 978-80-87361-83-2. Dostupné z: [www.cbks.cz/SbornikTrebon18/Pokorny.pdf](http://www.cbks.cz/SbornikTrebon18/Pokorny.pdf), upraveno

Na fotografii lesa vidíme, že teplota podrostu lesa pod zápojem korun stromů je lehce nad 20°C. Nejchladnější jsou kmeny stromů při zemi („nasávají“ vodu z půdy), nejteplejší naopak koruny stromů.

Vypařováním vody z korun stromů se les ochlazuje. Stromy tak udržují chladnější prostředí pod svými korunami. Chladný vzduch je těžší, nemá proto tendenci stoupat do výšek a drží se spíše při zemi. V lese tak příliš nevzniká proudění vzduchu, které by jej vysušovalo. Zároveň chladný vzduch pojme méně vlhkosti než teplý a snáze se tak nasytí. Při mírném snížení teploty, díky jeho velké nasycenosti vodou, vodní páry kondenzují a doplňují vodu nedaleko od místa, kde se vypařila. Tento jev asi budete znát z deštných pralesů.

Evaporace v takovém lese s povrchem půdy krytým vegetací je minimální.

Na fotografii pole vidíme, že holá půda pole pod nepřilíživými vzrostlými plodinami dosahuje teplot okolo 45 °C. Nejchladnější jsou vlastní pěstované rostliny.

Zásadní rozdíl oproti lesu je obrácení teplot – povrch půdy se velmi zahřívá a je rozehrátý místy až k 50 °C, vzduch nad ní se ohřívá, stoupá vzhůru a odnáší vodu transpirovanou vegetací pryč, daleko od místa výparu. Proudění teplého vzduchu také způsobuje značnou evaporaci z půdy.

Zároveň takové pole vysušuje i své okolí – jelikož z něj teplý vzduch stoupá vzhůru, musí být odněkud nasáván jiný vzduch z okolních ploch (například z lesa). Tento vzduch se následně také ohřívá a stoupá vzhůru.

V případě, že by plodiny na poli byly vzrostlejší a lépe kryly povrch či by povrch půdy byl kryt plevelem, nebyla by teplota povrchu pole tolik vysoká.

Nyní už víte, jak velice se může lišit teplota v různých prostředích. Důležité ale je si uvědomit, že teplota zcela zásadně ovlivňuje, kolik vody může vzduch pojmout. Proto území, které je u nás pro malé množství srážek velmi suchou oblastí, může být v chladnějších oblastech zamokřené. Bližší představu by vám mohly dát následující úkoly. **Ve všech příkladech počítejte s normálními podmínkami (např. normální tlak) a výsledky uvádějte s přesností na jedno desetinné místo.**

5. Jaké nejvyšší množství vody (g) může pojmout 1 metr krychlový vzduchu při teplotě  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ? [0,5 b]

Při teplotě  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  je 1 metr krychlový vzduchu schopný pojmout 2,1 g vody.

Při teplotě  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$  je 1 metr krychlový vzduchu schopný pojmout 9,4 g vody.

Při teplotě  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  je 1 metr krychlový vzduchu schopný pojmout 30,3 g vody.

Povšimněte si, jak se zvyšující teplotou skokově narůstá množství vody, kterou je vzduch schopný pojmout.

6. Jaká je absolutní vlhkost vzduchu o relativní vlhkosti 70 % (okolo této hodnoty se pohybuje průměrná relativní vlhkost v ČR) při teplotě  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ? [0,5 b]

Vzduch bude obsahovat 70 % vody uvedené v řešení příkladu výše.

Při teplotě  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  a relativní vlhkosti 70 % jeden metr krychlový vzduchu obsahuje 1,5 g vody.

Při teplotě  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$  a relativní vlhkosti 70 % jeden metr krychlový vzduchu obsahuje 6,6 g vody.

Při teplotě  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  a relativní vlhkosti 70 % jeden metr krychlový vzduchu obsahuje 21,2 g vody.

Ve velice zjednodušeném příkladu se můžeme podívat i na princip vzniku srážek.

7. Ráno jsme naměřili teplotu  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  a relativní vlhkost 90 %. Jaké je maximální množství vody, které může metr krychlový takového vzduchu ještě pojmout, když se během dne ohřeje na  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ? Pokud by dosáhl 50% relativní vlhkosti a následující noc by byla o něco teplejší, přičemž by teplota klesla na  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ , vysráží se nějaká voda? Pokud ano, kolik? Při ochlazení na jakou teplotu ( $^{\circ}\text{C}$ ) nastane rosný bod? (Výsledek stačí s přesností na celé stupně.) V této úloze předpokládejte, že hustota vzduchu se s teplotou nemění (ve skutečnosti tomu tak úplně není, s rostoucí teplotou se vzduch roztahuje). Uveďte stručný postup. [2 b]

Ráno má vzduch absolutní vlhkost  $0,9 \times 6,8 = 6,12 \text{ g/m}^3$ . Pokud se během dne ohřeje na  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , může jeden metr krychlový pojmout dalších  $30,3 - 6,12 \approx 24,2 \text{ g}$  vody.

Pokud by dosáhl 50% relativní vlhkosti, množství vody, které bude obsahovat, je  $30,3 \times 0,5 = 15,2 \text{ g/m}^3$ . Následně se ochladí na  $10 \text{ }^\circ\text{C}$ , může tedy pojmout jen  $9,4 \text{ g}$  vody, přebytečná voda  $15,2 - 9,4 = 5,8 \text{ g/m}^3$  se vysráží.

Teplota rosného bodu je zhruba  $18 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Zásadní význam mají nejen pro člověka také odtoky vody z území. Ať už kvůli povodním, (ne)dostatku pitné vody nebo jestli bude možné daný rok využít vodní plochy k rekreaci. V této souvislosti se často mluví o lesích či mokřadech, které mají do jisté míry podobné vlastnosti.

#### 8. Jaký je vliv lesů na odtoky vody? [2 b]

Nadneseně řečeno, lesy fungují jako houba – v době, kdy je srážek málo, nadlepšují odtoky – odteče z nich více vody, než naprší. V době větších srážek naopak vodu zadržují a odtoky z nich jsou menší než množství srážkových úhrnů. To však neplatí donekonečna – po delší době vytrvalých dešťů jsou již lesy vodou plně napity a může z nich odtékat i o něco více vody, než kolik činí srážkové úhrny.

#### 9. Jak se změní režim odtoku po vykácení lesa? [1 b]

Po vykácení lesa zpravidla pozorujeme méně rovnoměrné (nárazové) odtoky. Zpočátku bývá celkové množství odtoků o něco větší, s delším časovým odstupem se celkové množství odtoků obvykle sníží.

Problém nedostatku vody (stejně tak jako jejího nadbytku) lidstvo řeší snad už od samého počátku. Na závěr se však ještě podíváme na příklad z bližší minulosti. V moři mezi Jižní Amerikou a Afrikou se nachází osamocený ostrov. Leží asi  $1300 \text{ km}$  od ostrova Svaté Heleny. Když na něm Britové v 19. století pro jeho významnou polohu chtěli zbudovat vojenskou základnu, narazili na zásadní problém – nedostatek pitné vody.

#### 10. Jak se tento ostrov jmenuje a jak byl vyřešen problém nedostatku pitné vody? (Nápověda: název ostrova začíná na A) [2 b]

Zmiňovaný ostrov se nazývá Ascension. Jedná se o sopečný ostrov, který byl ještě na počátku 19. století popisován jako suchý a pustý. Nevyskytovalo se na něm příliš mnoho živých organismů, ale mnohé z nich kvůli osamocenosti ostrova byly endemické. Právě kvůli nepříliš hostinným podmínkám pro člověka (a taky dílem kvůli jeho osamocenosti) byl po dlouhou dobu neobydlen. To se změnilo v 19. století, kdy se díky své strategické poloze uprostřed Atlantiku ideálně hodil na vojenskou základnu. Velkým problémem však byl nedostatek pitné vody. Srážek na ostrově nebylo mnoho a naprostá většina z nich velmi rychle odtekla.

A právě o řešení tohoto problému se zasloužili Charles Darwin a Joseph Hooker způsobem, který je fascinující i téměř po uplynutí dvou století. Na kopec (Green

Mountain) na ostrově od poloviny 19. století nechali vysázet desítky druhů nepůvodních rostlin, včetně mnoha druhů stromů (z nichž samozřejmě přežily jen některé druhy) s cílem vytvořit prales. Spolu s rostlinami bylo dovezeno také velké množství nepůvodní fauny. Během několika příštích desetiletí se vysázené rostliny proměnily na umělý mlžný les, který zajišťuje dostatek vody pro obyvatele ostrova. Na tomto příkladu můžeme sledovat, jak vegetace zcela přeměnila mikroklima nad částí ostrova tak, že už na počátku 20. století na něm volně rostly třeba bambusy a banány. Ostrov dodnes funguje spíše jako vojenská základna a převážná část ostrova, vyjma Green Mountain, kde byl vysázen umělý prales, je obdobně pustá jako dříve.

### 11. Jak si myslíte, že mohlo toto řešení fungovat? [2 b]

Vysázený les „zúrodnil“ půdu, která tak je schopna zadržet mnohem více srážek, jež by normálně po víceméně holé půdě odtekly. Zároveň chrání povrch před nadměrnou evaporací. Zvýšení množství vody se přičítá schopnosti rostlin, zejména pak stromů, které mají velký povrch, vychytávat vodu z vlhkého vzduchu, např. z mlhy (i u nás známe pročesávání mlhy horskými lesy). Otázka, zda se významně zvýšilo množství dešťových srážek, je stále nedořešená (naráží se i na problémy s přesností původních hodnot), nepovažuje se to ale za příliš pravděpodobné.

### 12. Mělo toto řešení i nějaké negativní důsledky pro život na ostrově? [1 b]

Zavlečení nepůvodních rostlin a živočichů a celková proměna ekosystémů měla, asi nepříliš překvapující, neblahý vliv na mnohé z endemických druhů na ostrově, z nichž některé jsou na pokraji vyhynutí (i proto zřejmě Hooker nakonec litoval svého plánu vysázení pralesa). Dnes jsou na ostrově snahy udržet balanci mezi starým a novým a investuje se do záchrany ohrožených druhů.

### Bonus na konec

Téma silně související s vodou a evapotranspirací je dezertifikace, slovo, které zní hrozivě už jen samo o sobě. Koho zajímá boj s dezertifikací či jen prostě příroda a životní prostředí, tomu vřele doporučuji následující video „How to green the world's deserts and reverse climate change“ dostupné na: <https://youtu.be/vpTHi7O66pl> (je i s českými titulky o:), které je sice trošku delší, ale rozhodně stojí za to! Pokud nad tím někdo zapátrá víc, zjistí, že výsledky jsou skutečně v mnoha případech ohromující. Samozřejmě vždy je potřeba brát vše s rezervou a poohlížet se i nad možnými negativními důsledky. Důležitá myšlenka, a sice, že nekontrolované přezvěření také není správnou cestou, je ve videu zmíněna, ale mezi hromadou ostatních může snadno zapadnout, a proto bych doporučil ještě jeden, tentokrát krátký příběh, „How wolves change rivers“, který můžete najít na adrese: <https://youtu.be/ysa5OBhXz-Q>.

*Daniel Pluskal (e-mail: pluskal.daniel@gmail.com)  
ve spolupráci s Ing. RNDr. Martinem Markem, Ph.D.*

Martin Marek pochází z malé zemědělské vesíky na Vysočině, a tak není velkým překvapením, že jeho kroky nejprve vedly na pražskou zemědělskou univerzitu, kde vystudoval zemědělské inženýrství. Jelikož však toto studium nedokázalo úplně odpovědět na všechny jeho otázky, tak se posléze přihlásil ke studiu odborné biologie na Karlově univerzitě, aby se prostě dozvěděl co nejvíce o tom, jaké formy organismů se vyvinuly na této planetě a jak tyto tvorové fungují na molekulární úrovni. V rámci dlouhodobých postdoktorandských stáží působil několik let ve virologické laboratoři Wageningenské univerzity (Nizozemí) a v Ústavu molekulární a buněčné biologie ve Štrasburku (Francie), kde získával zkušenosti s přípravou proteinových komplexů a jejich strukturní analýzou. Martin je spoluautorem více než 40 vědeckých publikací, 4 kapitol v knihách a 2 mezinárodních patentů. V Loschmidtových laboratořích na Masarykově univerzitě nyní vede tým Strukturní biologie, který se zabývá studiem molekulární struktury a mechanismů proteinových katalyzátorů (enzymů) a dekodováním principů jejich evoluce. Získané poznatky se snaží dále využít v konstrukci vylepšených forem enzymů pro biotechnologické aplikace či syntetickou biologii. Ve volném čase si rád zahraje fotbal, squash, nebo se prostě jen tak kochá krásami přírody. Mezi jeho nejoblíbenější živé tvory patří hmyz a houby.



## 4. Praní špinavých proteinů

20 bodů

V první sadě letošního ročníku IBISu vyšla úloha s kryptickým názvem „Zničehonic něco“. Pokud si na ni milí řešitelé, pamatujete, tak již víte, jak moc je rekombinantní technologie vědě nápomocná, odkud bereme informace o proteinech, které chceme vyrábět, jaké hostitelské organismy pro jejich výrobu volíme, jak do nich naši informaci dostáváme, jak odlišíme mikroorganismy, které naši informaci opravdu mají, od těch, které se tak jen tváří, a nakonec jak je přesvědčíme, aby nám náš protein vyrobily. A pokud si na ni pamatujete opravdu dobře, vzpomenete si také na autorovu výhrůžku, že k úloze chystá pokračování. No, a tak je to tady.

V závěru „Zničehonic něčeho“ jsme dospěli do bodu, kdy máme protein zájmu vyprodukovaný a hezky uskladněný v hlubokozmražené biomase. Protein se v této chvíli nachází uvnitř buněk hostitele ve směsi s všelijakými běžnými buněčnými proteiny, nukleovými kyselinami a dalšími složkami hostitelského organismu; takto „špinavý“ protein má ale jenom omezené využití, a proto se musíme zabývat tím, jak jej získat v co nejčistším stavu: jak jej **purifikovat**.

Počátečním krokem purifikace je rozrušení hostitelských buněk, aby nám protein vyplaval do roztoku, a tím se nám zpřístupnil pro další práci. Buněčná suspenze je tedy opatrně rozmrazena a dezintegrována například ultrazvukem ve speciálních sondových sonikátorech anebo vysokým tlakem v přístrojích principiálně připomínajících french press na kávu. Pokud uznáme za vhodné, v této fázi přidáváme také DNázy, RNázy či jiná činidla likvidující různé rozpustné složky buněk, které by dříve či později v procesu purifikace mohly dělat neplechtu. Jakmile biomasu řádně potrápíme, umístíme ji do preparativní centrifugy a odstředíme<sup>1</sup> ji tak dlouho, dokud se všechny nerozpustné složky směsi pevně neusadí na dně centrikonu (centrifugační zkumavky). Roztok nad usazeninou opatrně odlijeme, přefiltrujeme od

<sup>1</sup> Výrazy „odstředovat“ a „centrifugovat“ jsou synonymní.

posledních zbytků pevných látek a získáme tak tzv. **bezbuňčný extrakt** (anglicky „cell-free extract“, zkráceně CFE).

1. Pokud centrifugujeme suspenzi, dochází k jejímu rozdělení na dvě složky – pevnou (zpravidla usazenou na dně) a kapalnou. Jakými termíny či pojmy v kontextu centrifugace tyto dvě složky nazýváme? [0,5 b]

Pevnou složku označujeme termíny peleta, pelet nebo sediment. Kapalnou složku označujeme jako supernatant.

2. Při centrifugaci, obzvláště při vyšších otáčkách, si musíme dávat pozor, aby byl rotor centrifugy dobře vyvážený. Představte si, že do rotoru centrifugy proti sobě vložíte dva vzorky, které ale zapomenete vyvážit: jeden z nich váží 10 gramů, druhý z nich 11 gramů (váženo při běžném tíhovém zrychlení, tedy  $1 \times g$ ). Jaký bude rozdíl v tíhové síle působící v centrifuze na tyto dva vzorky, pokud na ně při centrifugaci působí tíhové zrychlení  $20\,000 \times g$ ? Výsledek uveďte v newtonech, hodnotu tíhového zrychlení uvažujte  $9,81 \text{ m} \cdot \text{s}^{-2}$ . [1 b]

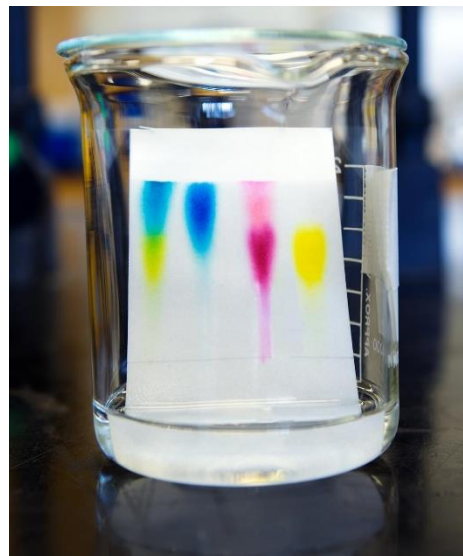
Tíhovou sílu vypočteme z 2. Newtonova zákona, vzorcem formulovaného jako

$$F = m \cdot a$$

kde „ $F$ “ je síla, „ $m$ “ hmotnost tělesa a „ $a$ “ zrychlení. Na vzorek vážící 10 gramů tedy v naší centrifuze působí síla  $0,01 \cdot 20000 \cdot 9,81 = 1962 \text{ N}$ , na vzorek vážící 11 gramů zase  $0,011 \cdot 20000 \cdot 9,81 = 2158,2 \text{ N}$  – rozdíl jednoho gramu ve hmotnosti vzorků tedy způsobil rozdíl celých 196,2 N v tíhové síle, která na vzorky působí – ekvivalent zátěže vážící 20 kg při běžném zrychlení!

Bezbuňčný extrakt je stále vysoce komplexní směs všeho rozpustného, co se jen v hostitelských buňkách nacházelo – nyní se ale na rozdíl od původní biomasy jedná o roztok, vysoce homogenní kapalnou směs, při jejímž zpracování se nabízí rozsáhlá paleta preparativních metod a technik sloužících k oddělování složek směsi od sebe. Tyto tzv. **separační metody** složky směsi rozdělují na základě rozdílů v jejich fyzikálně-chemických vlastnostech. První rodina takových rozdělovacích metod, kterou se budeme zabývat, je **chromatografie**.

Zkoušeli jste někdy v hodinách chemie nebo fyziky chromatograficky rozdělit barvu z lihovky? Běžně se postupuje tak, že se černou lihovkou udělá tečka na proužek filtračního papíru, jehož jeden konec se ponoří do vody nebo nízkoprocentního alkoholu (viz obrázek 1). Když pak kapalina vzlíná papírem, bere s sebou i černou barvičku, která se, světe div se, rozděluje na modrou, červenou a žlutou skvrnu, která každá cestuje jinou rychlostí. To jsou věci, co? A kromě toho, že taková papírová chromatografie je pokus hezký a barevný, můžeme na ní pozorovat všechny znaky chromatografie jako takové. V kostce: roztok směsi, kterou chceme rozdělovat, necháváme cestovat prostředím, takzvanou maticí, se kterým rozlišné složky směsi interagují různou měrou, a tak jsou různou měrou



Obr. 1: Tenkovrstevná chromatografie různých barev inkoustu, 4 vzorky vedle

zpomalovány ve svém cestování. Matrice se při chromatografii nehýbe, říkáme jí proto **stacionární fáze**, v případě naší papírové chromatografie je stacionární fází náš filtrační papír. Kapalina, která přes stacionární fázi unáší náš vzorek, se logicky nazývá **mobilní fáze** – to je voda či alkohol, který naším filtračním papírem vzlíná. A právě typem stacionární i mobilní fáze a typem interakcí, které zprostředkovávají, se od sebe jednotlivé typy chromatografie liší.

Učebnicovým typem chromatografie využívané pro separaci proteinů je **gelová permeační chromatografie**, také nazývaná jako **gelová filtrace**. Při této metodě putuje rozdělovaná směs trubicí (tzv. **kolonou**, viz obrázek 2) naplněnou maličkými kuličkami gelu, často založeného na bázi polysacharidů nebo oxidu křemičitého. Tyto kuličky v sobě mají mikroskopické póry. Když gelem cestují objemově velké molekuly, do pórů v gelu se nevejdou, a tak kolonou prochází rychle. Čím jsou však cestující molekuly objemově menší, tím více a častěji do pórů gelu po cestě kolonou zabloudí, v pórech se zdržují a tím déle jim následkem toho trvá kolonou projít. Gelová chromatografie tedy rozděluje molekuly na základě jejich objemu, tvaru a hmotnosti. V praxi to vypadá tak, že na jednu stranu kolony nanese náš vzorek a na druhé straně protékající mobilní fázi zachycujeme po malých frakcích – prvních X mililitrů do jedné zkumavky, dalších X mililitrů do další zkumavky a tak dále po celý průběh separace – kdybychom takovou frakcionaci neprováděli, po skončení procesu bychom vlastně získali stejnou směs jako na začátku. Důležitou veličinou, kterou nejen při gelové chromatografii, ale i u ostatních typů chromatografie měříme, je tzv. **retenční objem** (značeno  $V_r$ ) – to je takový objem mobilní fáze, který musí chromatografickou kolonou projít, aby se určitá látka dostala od začátku kolony na její konec. Když tedy na kolonu nanese

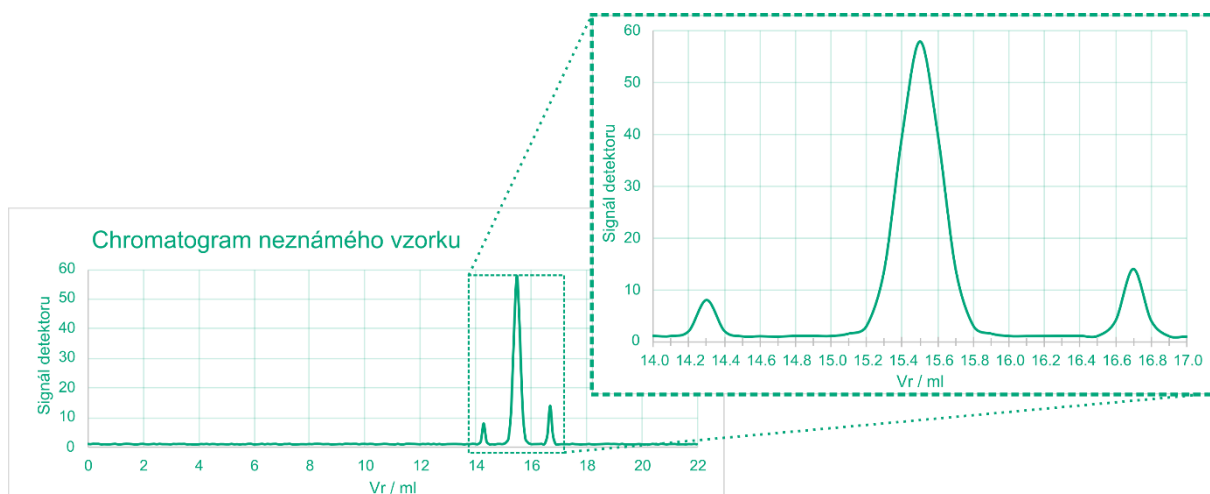


Obr. 2: Gravitačně poháněná gelová chromatografie.

vzorek směsi a víme, že jeho složky mají na naší koloně retenční objem třeba 20 a 30 mililitrů, pak víme, že kolonou musí protéct právě 20 mililitrů mobilní fáze, aby z kolony vytekla první ze složek směsi, a dalších 10 mililitrů mobilní fáze, aby vytekla i složka druhá.

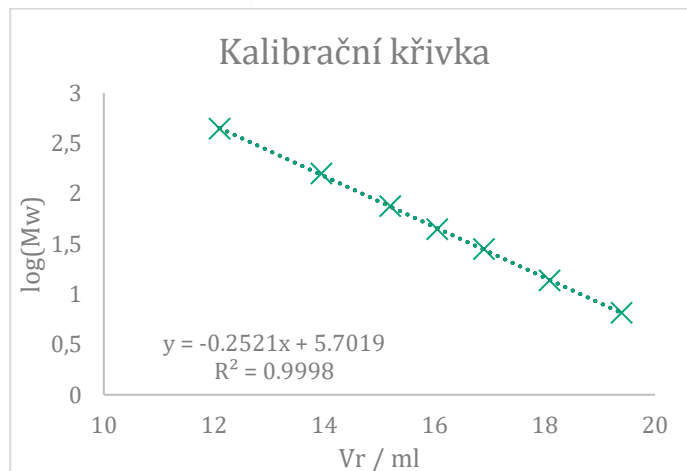
3. Gelová chromatografie rozděluje molekuly na základě jejich tvaru a velikosti. Pokud danou kolonu nakalibrujeme tak, že jí necháme projít sadu molekul o podobném tvaru a známých molekulových hmotnostech, můžeme získat závislost molekulové hmotnosti procházejících látek na jejich retenčním objemu. Když pak kolonou necháme projít molekulu o neznámé molekulové hmotnosti, na základě jejího retenčního objemu můžeme její hmotnost vypočítat, což také bude váš úkol. Po pravé straně naleznete tabulku proteinů, kterými jsme nakalibrovali naši kolonu a níže chromatogram vzorku získaný na stejné koloně (vzorek byl na kolonu nanesen v čase 0).

Složky kalibračního roztoku		
Protein	$M_w$ / kDa	$V_r$ / ml
Ferritin	440	12,10
Conalbumin	75	15,20
Cananhydráza	28	16,90
RNáza	13,7	18,09
Aldoláza	158	13,95
Ovalbumin	44	16,05
Aprotinin	6,5	19,40



- a. Sestrojte kalibrační křivku naší kolony pomocí údajů zadaných v tabulce tak, že v grafu vynesete závislost logaritmu molekulové hmotnosti proteinů na jejich retenčním objemu a vzniklou závislost proložíte přímkou. Získaná rovnice přímky je řešením této části úlohy. [2 b]

Rovnici společně s grafem (ten není součástí řešení) je možno vidět níže.



- b. Z poskytnutého chromatogramu vzorku odečtete retenční objemy všech složek vzorku v jednotkách ml s přesností na jedno desetinné místo. Pozor, hodnoty z grafu odečítejte v bodě, kde pík dosahuje maxima, tedy nikoliv v bodě, ve kterém začíná! [1,5 b]

Retenční objem složek vzorku činí 14,3 ml, 15,5 ml a 16,7 ml (v chromatogramu zleva doprava).

- c. Na základě rovnice přímky získané v první části této úlohy vypočtete molekulovou hmotnost všech složek vzorku v jednotkách kDa. [1,5 b]

Z rovnice přímky si vyjádříme vzorec pro molekulovou hmotnost:

$$M_w = 10^{-0,2521 V_r + 5,7019}$$

Po dosazení retenčních objemů odečtených z chromatogramu vzorku získáváme hmotnosti složek 125 kDa, 62,3 kDa a 31 kDa (při dosazování v pořadí uvedeném v řešení bodu b této úlohy).

- d. Pokud víte, že ve vzorku se nacházel jediný protein, co můžete říct o jeho kvarterní struktuře? [1,5 b]

Molekulové hmotnosti složek směsi jsou v poměru zhruba 4:2:1. Pokud víme, že se ve směsi nachází jediný protein, můžeme říct, že se vyskytuje ve formě monomeru, dimeru a tetrameru, z čehož dimer je zdaleka nejzastoupenější oligomerní stav. Taková možnost je nejpravděpodobnější, stále ale hádáme – protein se klidně může vyskytovat třeba ve formě dimeru, tetrameru a oktameru nebo jakékoliv jiné kombinaci oligomerních stavů odpovídajících hmotnostnímu poměru 4:2:1.

Pro separaci proteinů je velice významná chromatografie založená na chemické afinitě. A co to vlastně je? Chemická afinita obrazně řečeno vyjadřuje, jak se mají molekuly rády. Pokud k sobě mají dvě molekuly vysokou afinitu, rády zůstávají pohromadě, tvoří vazebné i nevazebné interakce, zkrátka jsou rády spolu. Taková kombinace molekul s vysokou afinitou je třeba ethanol a voda – když tyto dvě látky smícháme, rády se smísí, protože jsou molekuly

obou látek polární. Opak nastává, pokud se molekuly rády nemají, třeba jako voda a olej, které nesmísíte, ani kdybyste se opravdu snažili. Pamatujete na salátovou zálivku? Při naší chromatografii ale nevyužíváme jen tak nějaké molekuly – využíváme takové, které jsou vybíravé, které se nemají rády jen tak s někým, a tak vykazují afinitu k velmi omezenému počtu jiných molekul. Jak tedy samotný proces probíhá? Představte si, že stojíte na ulici a okolo vás proudí davy lidí (samozřejmě s rouškami, maximálně po dvou a s patřičnými rozestupy). Tu a tam se ale v davu mihne nějaký váš známý. Zavoláte na něj, on se zastaví, zamává na vás, dojde k vám, a tak si začnete povídat. Uvidíte ale dalšího známého, tak na něj zase zavoláte a už jste v kolečku tři. A už jste čtyři. A najednou je vás pět, šest... Tak si tak povídate, začíná se stmívat a ulice je najednou prázdná kromě vás a vašeho hloučku známých. Co se ale nestane, najednou vidíte, že se k vám blíží skupinka vašich nejlepších kamarádů, prostě těch pravých BFF – ty máte rádi víc než nějaké známé, k těm máte větší afinitu. Se známými se tedy rozloučíte, ti se v hloučku vydají pokračovat ve své původní cestě a vy se vesele přidáváte k té vaší, správně řečeno skupince. Vidíte ale, co jste udělali? Ne, nemyslím tím, že jste svým známým nonšalantně ukázali, že je vlastně až tak rádi nemáte. Mám na mysli to, že jste z obrovského množství jiných lidí vytřídili pouze ty, ke kterým máte nějakou afinitu. A stejně tak funguje **afinitní chromatografie**. Kolonou necháváme protékat komplexní směs, která se na stacionární fázi chemicky třídí. Pokud je molekula afinní ke stacionární fázi, zůstane na koloně navázaná, pokud k ní afinní není, tak prostě proteče a odplave pryč. Když pak přidáme do mobilní fáze nadbytek něčeho, co je ke stacionární fázi ještě více afinní než molekula našeho zájmu, touto látkou všechny molekuly navázané na koloně vytěsníme a uvolníme a na konci kolony už můžeme chytat naše „nalovené“ molekuly.

4. Za určitých podmínek můžeme pro afinitní purifikaci využít přirozených interakcí. Pokud třeba víme, že protein X rád a dobře váže látku Y, můžeme pro jeho vychytávání ze směsi jako stacionární fázi použít imobilizovanou látku Y. Jakou látku byste ve stacionární fázi imobilizovali, pokud byste s její pomocí chtěli vyseparovat:

a. Veškerou DNA z bezbuněčného extraktu nehledě na její sekvenci? [0,5 b]

Pro afinitní chromatografii DNA o neznámé sekvenci můžeme využít proteiny nespecificky vážící DNA, například histony.

b. Konkrétní DNA o známé sekvenci ze směsi nukleových kyselin? [0,5 b]

Pro separaci DNA o známé sekvenci můžeme využít komplementární sekvenci bází vyskytující se v hledané DNA.

c. Pouze glykosylované proteiny ze směsi jiných proteinů? [0,5 b]

Glykosylované proteiny mají na rozdíl od neglykosylovaných na svém povrchu navázanou sacharidovou strukturu, pomocí které je můžeme od ostatních odlišit – zaměříme se tedy na sacharidovou složku, nikoliv na proteinovou. Pro separaci můžeme využít stacionární fázi na bázi lektinů (sacharidy vážících proteinů) nebo boronových kyselin (deriváty kyseliny

borité, které mají jednu z hydroxylových skupin nahrazenou organickým zbytkem).

**d. Receptorový protein pro určitý hormon z krevního séra? [0,5 b]**

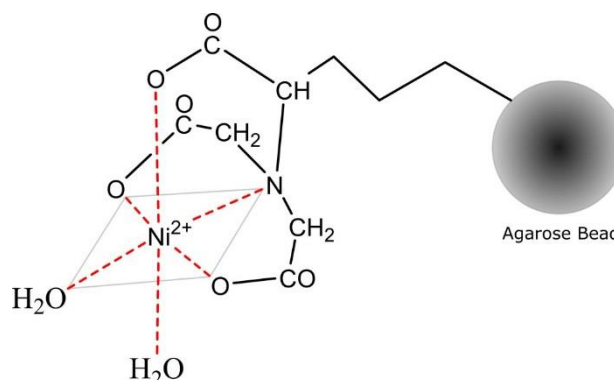
Pro izolaci receptorového proteinu volíme buďto přímo receptorem detekovaný hormon anebo jeho analog.

**e. Imunoglobuliny z krevního séra? [0,5 b]**

Pro izolaci veškerých imunoglobulinů využíváme imunoglobulin-specifické vazné proteiny (např. protein A nebo protein G), pro izolaci konkrétních protilátkových forem imunoglobulinů zase příslušné antigeny.

Zatímco v určitých případech můžeme využít přirozených interakcí molekul, často takové štěstí nemáme – vhodná interakce neexistuje, je příliš slabá anebo třeba příliš nespecifická. Při afinitní chromatografii rekombinantních proteinů pak rádi využíváme toho, že produkovaný protein můžeme dle libosti upravovat. Na některý jeho konec tedy připevníme nějakou „kotvu“, vybereme si stacionární fázi, na kterou se kotva specificky váže, a tak spolu s kotvou nachytáme i náš protein. Protein pak z kolony vyplavíme třeba volnou kotvou (nepřipevněnou k žádnému proteinu) nebo nějakou látkou, která kotvu imituje. Pro purifikaci proteinů se velmi často využívá tzv. metaloafinitní chromatografie, která je v principu ještě o trošičku složitější.

Příkladem nám budiž systém Ni-NTA. Zde tvoří stacionární fázi imobilizovaná nitrilotrioctová kyselina (NTA), kterou „nabijeme“ pomocí roztoku nikelnaté soli. Nikl tvoří s NTA chelát skrze čtyři koordinační vazby (viz obrázek 3). Protože však nikl preferuje koordinační číslo 6, disponují vázané ionty stále ještě dvěma dalšími koordinačními pozicemi, které jsou obsazené pouze slabě vázanými molekulami vody, a tak hledají pro koordinační vazbu stabilnějšího partnera. Gen pro protein, který tímto systémem plánujeme purifikovat, ještě před vložením do hostitelského organismu upravíme tak, aby měl finální protein na jeden konec připevněných šest histidinů za sebou – takzvanou hexahistidinovou kotvu: při purifikaci se pak histidinová kotva velmi dobře váže na zmíněné (téměř) volné koordinační pozice niklu a způsobuje vychytávání proteinu zájmu ze směsi. Vyplavení našeho navázaného proteinu se pak provádí roztokem imidazolu nebo volného histidinu, který histidinovou kotvu z komplexu s niklem vytěsňuje. (Podobnost histidinu a imidazolu můžete vidět v obrázku 4).



Obr. 3: Schéma způsobu, jakým se nikl chelatuje na nitrilotrioctovou kyselinu.

Obr. 4: Srovnání struktury molekul histidinu a imidazolu.

**5. Pokud pomocí Ni-NTA kolony izolujeme hexahistidinovou kotvou značený protein přímo z bezbuněčného extraktu, promývání kolony roztokem imidazolu probíhá**

obvykle dvoukrokově: kolona se promyje nejprve roztokem o nízké koncentraci imidazolu (tím dojde k vyplavení frakce, kterou si označíme písmenem A) a až potom roztokem o finální, vysoké koncentraci imidazolu (tak dojde k vyplavení frakce B). Zatímco frakce B je obvykle velmi čistá a obsahuje pouze hexahistidinovou kotvou značený protein, frakce A může být do jisté míry znečištěna některými složkami bezbuněčného extraktu, které se na Ni-NTA kolonu mohou nespecificky vázat. Co jsou tyto nečistoty zač? Proč se na kolonu vážou? [2 b]

Nečistoty, které se mohou na Ni-NTA kolonu nespecificky vázat, jsou na histidin bohaté proteiny. Histidin je aminokyselina, která se v proteinech vyskytuje běžně – občas tedy může dojít k náhodné nespecifické vazbě proteinu na kolonu zprostředkované v proteinech přirozeně se vyskytujícím histidinem. Čím více histidinů v neznačeném proteinu je, tím větší je pravděpodobnost takové vazby.

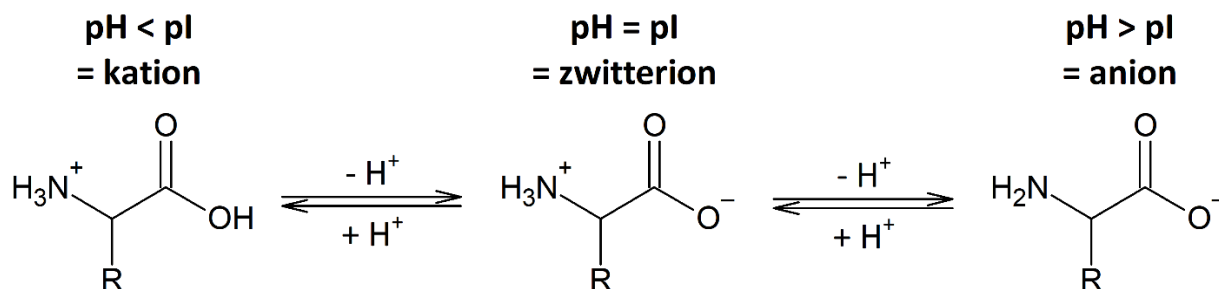
6. Při metaloafinitních purifikacích se někdy namísto nikelnatých iontů využívají ionty kobaltnaté. Jak nahrazení niklu kobaltem ovlivní výsledek purifikace? Proč tomu tak je? [1 b]

Odpověď na tuto otázku do jisté míry souvisí s odpovědí na otázku předchozí. Nikl komplexuje histidin velmi dobře, v některých případech však až příliš dobře a může tedy docházet k nežádoucím nespecifickým interakcím snižujícím čistotu získávaných proteinů.

Kobalt vykazuje vůči histidinu o něco nižší afinitu než nikl. Při vazbě na kobaltnatý iont jsou tedy ve výhodě histidinovou kotvou značené proteiny, ve kterých je více histidinů na jednom místě, oproti neznačeným proteinům, ve kterých je histidin zpravidla roztroušen.

Při použití kobaltu namísto niklu tedy vypurifikujeme ze stejného vzorku sice méně proteinu zájmu, ale dosahujeme tak vyšší čistoty.

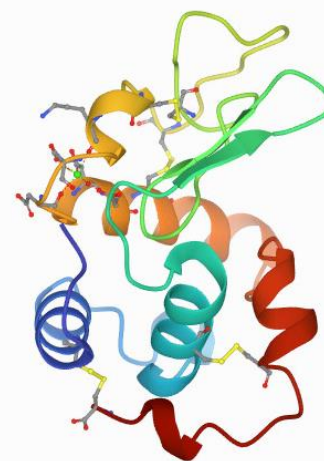
Jako amfolyt označujeme takovou molekulu, která obsahuje jak kyselé, tak zásadité funkční skupiny. Taková molekula se pak může vyskytovat jak ve formě aniontu, tak kationtu a to, v jaké formě se amfolyt zrovna nachází, záleží hlavně na pH prostředí: při nízkém pH je v roztoku spousta  $H^+$  iontů, amfolyt je přijímá a nabývá kladný náboj, při vysokém pH je zase  $H^+$  iontů nedostatek, a tak amfolyt uvolňuje vlastní  $H^+$  ionty, čímž získává náboj záporný. Někde mezi těmito stavy ale existuje rovnováha: takové pH, při kterém je v molekule stejné množství záporných a kladných nábojů, a tak molekula na venek vystupuje jako neutrální – náboje v molekule se zkrátka navzájem vyruší. Takovému stavu se říká **zwitterion** a pH, při kterém daná molekula existuje ve formě zwitteriontu, označujeme jako její **izoelektrický bod**, zkratkou pI. Typickým příkladem amfolytů jsou aminokyseliny. Ty vždy obsahují jak kyselou karboxylovou skupinu ( $-COOH$ ), tak zásaditou aminoskupinu ( $-NH_2$ ) a díky změnám v pH prostředí tak může docházet ke změnám v jejich náboji (viz obrázek 5 níže).



Obr. 5: Přechod iontových forem obecné aminokyseliny v závislosti na pH. Schéma nezahrnuje iontové změny, ke kterým dochází v postranním řetězci aminokyseliny. R = postranní řetězec.

Toho, že náboj aminokyselin, a tak i proteinů můžeme měnit pouhou změnou pH roztoku, využíváme při další chromatografické metodě pro separaci proteinů: takzvané **ionexové chromatografii**. Stacionární fází je v takovém případě **ionex**, což je látka, která také nese nějaký elektrostatický náboj. Pokud ionex nese kladný náboj, označujeme jej jako **anex** (protože z roztoku vychytává anionty), pokud nese záporný náboj, nazýváme jej analogicky **katex**. Pokud ionex označíme za silný, znamená to, že svůj náboj nese při téměř jakémkoliv pH, slabé ionexy svůj náboj mohou za určitých podmínek měnit, nicméně těmi se v této úloze pro zjednodušení zabývat nebudeme.

Jak taková ionexová chromatografie v praxi vypadá? Nejprve stanovíme pI našeho proteinu, buďto teoreticky, nebo experimentálně. Dle zjištěného pI si zvolíme, zda pro purifikaci zvolíme katex nebo anex: pro proteiny se zásaditým pI obvykle volíme katexy, pro proteiny s kyselým pI zase anexy. Na kolonu s ionexem pak protein nanese při takovém pH, aby náboj proteinu a ionexu byl opačný: protein se tedy na ionex elektrostatickými silami naváže. Kolonu promyjeme, abychom vyplavili všechny nenavázané nečistoty, a pak kolonu promyjeme roztokem o pH, při kterém má protein stejný náboj jako ionex, přitažlivá síla mezi proteinem a ionexem se tedy změní na odpudivou a náš protein se tím uvolní.



Obr. 6: Lysozym z mléka ježury australské (*Tachyglossus aculeatus*).

7. Představte si, že chcete purifikovat protein lysozym z mléka ježury australské (struktura proteinu pro zajímavost v obrázku 6), jehož sekvence je:

KILKKQELCKNLVAQGMNGYQHITLPNWWCTAFHESSYNTRATNHNTDGSTDYGILQI  
NSRYWCHDGTKTPGSKNACNISCKLLDDDDITDDLKCAKKIAGEAKGLTPWVAVKSKC  
RGHDLSKFKC

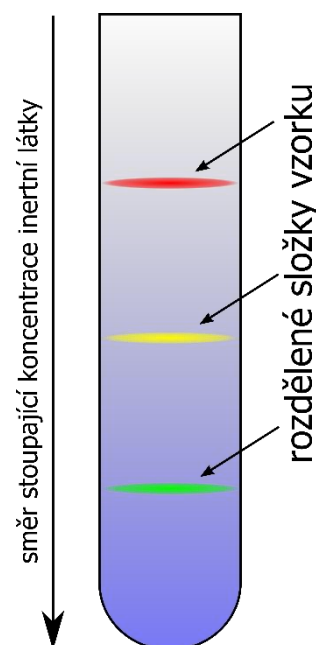
- a. V prohlížeči si otevřete nástroj [ProtParam](#), vložte do něj sekvenci vašeho proteinu a zjistěte jeho teoretickou hodnotu pI. [1 b]

Teoretická hodnota pI našeho proteinu je 8,91.

- b. Protein budete purifikovat na silném katexu. Navrhněte pH, při kterém budete protein na katex nanášet a následně pH, při kterém protein z katexu uvolníte. [1 b]

Při nanášení potřebujeme, aby se zachycoval na katexu, tedy aby měl protein kladný náboj. Toho dosáhneme při pH kyseljším, než je pI proteinu, například při pH 7,0. Při uvolnění potřebujeme, aby měl protein stejný náboj jako katex, tedy záporný, čehož dosáhneme zvýšením pH nad hodnotu pI proteinu, například na hodnotu 10,0.

Na začátku této úlohy jsme si představili centrifugaci jako preparativní metodu, pomocí které rutinně oddělujeme směsi složené z více fází – směsi jsou při odstředování vystavovány obrovským přetížením dosahujícím až dvacetitisícnásobku gravitačního zrychlení a složky směsi se následkem toho rozdělují. Co kdybych vám ale řekl, že tato už tak působivá metoda má ještě mladšího, zato dost nasvaleného sourozence jménem **ultracentrifugace**. Při této metodě vzorky vystavujeme neskutečným přetížením dosahujícím až 1 000 000×g, což je síla tak obrovská, že se v centrifugovaných vzorcích rozdělují nejenom jednotlivé fáze, ale dokonce i látky rozpuštěné v jedné a té stejné fázi! V praxi se nejčastěji využívá ultracentrifugace gradientová. Do centrikonu připravíme gradient nějaké inertní látky, často sacharózy anebo chloridu cesného. Pokud chceme pracovat s gradientem inertní látky v rozmezí koncentrace třeba 20–60 %, na dno centrikonu napipetujeme trochu 60% roztoku, na něj opatrně stejný objem 55% roztoku, na něj zase stejný objem 50% roztoku, a tak pokračujeme, dokud se nedostaneme k 20% koncentraci. Takto připravený centrikon pak necháme v chladu odstát, aby se ostré hranice mezi jednotlivými koncentracemi látky samovolně promísily a vznikl tak její kontinuální koncentrační gradient, jaký můžete vidět na obrázku 7: směs je tedy od hladiny ke dnu plynule koncentrovanější a koncentrovanější, a tím i hustší a hustší. Na hladinu takového roztoku pak velice opatrně nanese náš vzorek a necháme jej v ultracentrifuze odstředovat. A to, co se s ním při centrifugaci stane, záleží na tom, jestli jej budeme centrifugovat izokineticky nebo izopyknicky.



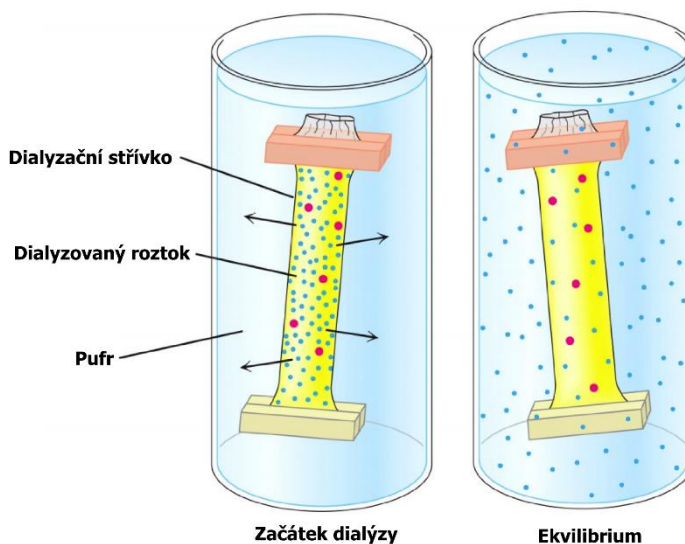
Obr. 7: Zjednodušené schéma rozdělování složek směsi centrifugací v gradientu.

8. Centrifugaci v gradientu můžeme dle provedení rozdělit na centrifugaci **izokinetickou** a **izopyknickou**. Čím se od sebe tyto dva typy centrifugace liší? Na základě kterých svých vlastností se při nich látky separují? [3 b]

Při izokinetické centrifugaci je nejvyšší hustota, které dosahuje gradient inertní látky, nižší než hustota složek vzorku. Složky vzorku se při takové centrifugaci rozdělují na základě svého sedimentačního koeficientu, tedy rychlosti sedimentace – ta závisí nejenom na hmotnosti, ale částečně i na velikosti a viskozitě látek. V tomto případě si tedy musíme dát pozor, abychom centrifugaci zastavili včas:

pokud bychom ji nechali probíhat příliš dlouho, všechny složky vzorku by se opět sešly na dně centrikonu a nic bychom neodseparovali.

Při izopyknické centrifugaci se hustota složek vzorku pohybuje někde mezi dolní a horní hustotou gradientu inertní látky. Složky vzorku v tomto případě cestují gradientem tak dlouho, dokud nenarazí na hladinu, která odpovídá jejich hustotě. Dál už cestovat nemohou, a tak se zastaví a hromadí v té „své“ vrstvičce gradientu o správné hustotě. Veličina, na základě které se látky při tomto typu centrifugace dělí, se nazývá vznášivá hustota.



Obr. 8: Schematický náčrt stavu dialyzační aparatury před začátkem dialýzy a po dosažení ekvilibría. Velké červené kuličky znázorňují protein či jinou makromolekulu, modré kuličky jsou nízkomolekulární látky.

Možná jste si všimli, že při množství separačních metod, které jsme si v této úloze představili, získáváme naše biomolekuly nikoliv čisté, ale ve směsi s nějakým činidlem. Například v případě afinitní chromatografie vzorek znečišťuje látka, pomocí které biomolekulu uvolňujeme z kolony, v případě ultracentrifugace zase látka, pomocí které jsme vytvářeli gradient. Jak se těch malých potvůrek zbavit? Právě fakt, že jsou tyto látky oproti obrovským biomolekulám maličkaté, je naše záchrana. V tomto případě nám totiž pomůže proces jménem **dialýza**.

Jak jste v hodinách biologie již určitě slyšeli, dialýza je proces přestupu látek přes semipermeabilní, tedy polopropustnou membránu: taková membrána si nějakým způsobem vybírá, jaké látky skrze ni projdou a jaké ne. V našem případě bohatě stačí membrána, která v sobě má póry dostatečně velké na to, aby jimi prošly nízkomolekulární látky, kterých se chceme zbavit, ale ne dost velké na to, aby jimi prošly naše biomolekuly. Do střívka z takové membrány dáme vzorek naší biomolekuly, střívko uzavřeme a necháme plavat ve velkém nadbytku roztoku, ve kterém chceme naši biomolekulu nakonec mít. Zatímco nízkomolekulární látky membránou projdou a rozředí se v celém objemu (objem střívka + objem roztoku, proti kterému vzorek dialyzujeme), velká biomolekula ve střívku setrvává (viz obrázek 8). Dialýzu můžeme ještě zefektivnit tak, že po první dialýze vzorek dialyzujeme znovu proti čerstvému dialyzačnímu roztoku. Nízkomolekulárních potvůrek se sice nezbavíme úplně, ale naředíme je natolik, že jejich přítomnost ve vzorku pro nás bude zanedbatelná.

## 9. Vzorek proteinu, který jsme purifikovali metodou metaloafinitní chromatografie, má objem 5 ml. Ve vzorku se nachází protein o koncentraci 5 mg/ml, Tris<sup>2</sup>

<sup>2</sup> Tris je triviální název pro nízkomolekulární látku tris(hydroxymethyl)aminomethan.

o koncentraci 50 mM a imidazol o koncentraci 400 mM. Vzorek umístíme do dialyzačního střívka a dialyzujeme proti 5000 ml roztoku Tris o koncentraci 100 mM. Jaká je výsledná koncentrace proteinu, Tris a imidazolu uvnitř střívka potom, co dialýza dosáhne ekvilibria? [1,5 b]

Imidazol se na začátku dialýzy vyskytuje pouze ve střívku, a to v koncentraci 400 mM. Po dosažení ekvilibria dojde k jeho naředění  $(5 + 5000) / 5 = 1001\times$  a jak uvnitř střívka, tak v celém objemu dialyzačního roztoku tedy bude jeho finální koncentrace rovna  $400 / 1001 \cong 0,4 \text{ mM}$ .

Tris se na začátku dialýzy vyskytuje jak ve střívku (v koncentraci 50 mM) i v dialyzačním roztoku (v koncentraci 100 mM). Ve střívku se tedy nachází  $0,005 \times 50 = 0,25 \text{ mmol}$  Tris, v dialyzačním pufru zase  $5 \times 100 = 500 \text{ mmol}$  Tris, dohromady tedy pracujeme s 500,25 mmol Tris. Výsledná koncentrace Tris jak uvnitř střívka, tak v celém dialyzačním roztoku činí  $500,25 / 5,005 = 99,95 \text{ mM}$ .

Protein membránou střívka neprochází a jeho koncentrace se tedy dialýzou nezmění. Po dosažení ekvilibria dialýzy se ve střívku bude stále nacházet v koncentraci **5 mg/ml**. V dialyzačním roztoku se protein nebude nacházet žádný.

A tak jsme spolu, milí řešitelé, došli až na konec úlohy. A věřte mi, že jste vykonali kus práce. Seznámili jste se s těmi nejvyužívanějšími a nejdůležitějšími metodami purifikace proteinů i jiných biomolekul, věřte mi však, že jsme si v celém tom biotechnologickém oceánu sotva omočili chodidla. Snad mi odpustíte, že jsme si metod představili pouze těch pár nejprominentnějších, myslím si však, že úloha je už takto dost našlapaná všemožnými postupy a principy. Obor biotechnologie a biochemických metod obecně ale rozhodně nebyl vyčerpán, to vůbec ne: v blíže nespecifikovaném budoucnu se tedy určitě můžete těšit na úlohy pojednávající třeba o elektroforéze, optických metodách a dalších metodách přípravy a výzkumu nejen proteinů.

*„A tím končí naše komédie...“*

Jan Macek (e-mail: [janmacek249@gmail.com](mailto:janmacek249@gmail.com))

## 5. First aid

20 points

Everyone has heard about first aid (or so I do hope), but as an old Turkish proverb says “repetition is the mother of wisdom”. So in this assignment, we will be running through some basics of first aid, which are useful to know very well.

Let us start with the basics of basics, what is the purpose of first aid? – it’s quite simple really, it’s to keep the afflicted in an as good as possible state until the ambulance arrives. And that is the first problem – There are two numbers (as you probably know from kindergarten) that you can call – 155 and 112 (talking, here and in the rest of the assignment, about Czechia)

1. What is the difference between these two numbers? When would you use 112 and when 155? [1 b]

The 155 rings in the headquarters of your local ambulance and is therefore ideal for purely medical situations. 112 rings at the headquarters of the firefighters and their operator then coordinates the rest of the IZS (integrováný záchranný systém) action. You should call this number when you need multiple services (e.g. there is a building on fire and there are injured people...). Also, 112 is used in the whole EU (and some other countries) and the operator of this line has to speak English (handy when abroad).

2. How would you describe your exact position to a 155 operator? Write at least 5 things/ways that accurately pinpoint your location (imagine being in a city, in the mountains...) [1 b]

Ideally, it is an address (don’t forget to mention the story in which you are), but you can use multiple other things – the serial number of street lamps or fire hydrants, bus stops. When you are on a highway, there are points of rescue as well as the kilometre signs (you just have to mention the direction in which you are going). In the countryside, there are oftentimes “points of rescue” which you can use as well.

Well done, the paramedics are on their way. Now it is down to the business of not letting your patient die. There are standardized procedures to achieve this – so-called first aid “algorithms”.

3. Describe one such algorithm. The one I have learned is SSS ABC, but there are some others (DR’S ABC). Please write down what the individual letters stand for and then in one or two sentences summarize what are you supposed to do according to each point. [2 b]

Safety – Look around yourself, is there anything dangerous? (cars, dogs, people, falling trees...) Is the person bleeding? Don’t forget protection (gloves).

Stimulate – ask the person if he/she is OK (from a safe distance), if the person is unresponsive, try shouting. After that, approach the person from the head and shake them (no painful stimuli, do NOT shake with babies under one year – you may seriously harm them, we use gentle painful stimuli with babies...).

Shout for help – it is always better to work as a team, it is simply more efficient. Try to address specific people (hey sir! You in that blue sweater, please do XYZ) to avoid “bystander effect” (a google-worthy term :)

Airways – you have to open the airways by bending the head back (the chin goes up and back – if you try it, the person shouldn’t be able to swallow). This is to prevent the tongue (it’s back part) from obstructing the airways.

Breathing – place your ear against the mouth, looking at the rib cage. For ten seconds you are going to – feel the breaths, listen to the breathing sounds and look whether the rib cage is moving. If the person isn’t breathing or you are NOT sure, you should begin CPR

Circulation – usually omitted today, but you should still check whether the person isn’t pale. Alternatively (if the person is breathing normally) you can check the pulse – you can discover internal bleeding or something similar.

The evergreen of first aid is CPR or cardiopulmonary resuscitation. Its sole purpose is to maintain a little bit of blood circulation when the heart stops working.

4. What is the most common reason for heart failure in adults? Is it the same in children? How does the defibrillator (AED – automatic external defibrillator) work and is it more commonly used in adults or children? [1 b]

In adults, it is a heart attack – one part of the cardiac muscle stops working, this can desynchronise the heart rhythm (arrhythmia leading to fibrillation). This condition is curable by defibrillator – the electric shock “restarts” the heart rhythm.

In children, the primary reason is asphyxia. That is why we begin the CPR in children with 5 breaths – there is a chance that we can push the obstruction down to one lung, also the child has depleted all oxygen (that’s why the heart isn’t working) and we must therefore provide it.

And how is it done? The best explanation I have ever seen can be found here: <https://www.youtube.com/watch?v=tD2qTmDsiHk> (but there is a ton of other sources).

5. Describe CPR in adults (when do you start with CPR, frequency, hand placement, when do you stop resuscitating) What would you do differently when you should resuscitate a) a baby 0,5-year-old b) a child 5-years old. [1 b]

The CPR is indicated when the person stopped breathing, is “gaspings” or you are simply unsure about whether he is breathing or not. The frequency should be 100-120 pushes per minute, ideally with 2 breaths for every 30 pushes. You should put

the back of your hand between the nipples. The other hand goes on top of the first and, with your elbows straight, you begin to massage approximately one-third of the rib cage in depth. Make sure not to lose contact with the skin (no bouncing) yet always go all the way up. You can stop resuscitating only if a) a paramedic tells you so b) somebody takes it over c) you are in imminent danger d) you are completely exhausted

In children, you start with 5 initial breaths and then massage in a 15:2 compression/ breath ratio. Massage babies with two fingers (index and middle finger or both thumbs), older children with only one hand.

6. In the video, there is a little mention of “rescue breaths” (except for the “no kissing” line) – why is that? Are rescue breaths dangerous for the patient? Should we do them or not? [1 b]

Mostly it is to persuade people to resuscitate. Rescue breaths are lifesaving, but a lot of people find them disgusting and wouldn't, therefore, do anything. The “hands-only CPR” is much more likely to happen. Also, rescue breaths aren't easy to perform correctly.

It is best illustrated by today's situation – would you risk stripping someone's mask off and getting corona?

With heart failures out of the way, we can take a closer look at some other life-threatening situations. One of the most common ones is the obstruction of the airways – “choking”. When the airways are obstructed there is no fresh air in your lungs, meaning no oxygen in your blood (which is not particularly good for you).

7. You are sitting in a restaurant, eating as usual when you see a person getting up from a table. He is coughing like mad and is unable to breathe. What are you going to do? What if a) the person stops coughing? b) loses consciousness? [1 b]

The first thing is to ask the person, whether he wants your help. Secondly, you should sit him down, try to calm him down and encourage him to cough. If he stops coughing, you should combine backstrokes (5x) and Heimlich's manoeuvre (5x) and alternate these until the person spits the obstruction out or passes out. In the latter case, you should begin CPR – the compression increases the pressure in thorax forcing the obstruction out. You can also try the rescue breaths – you may push the obstruction into one lung.

Next thing we are going to talk about is haemorrhage. We have external bleeding (you see red stuff flowing/squirting from the patient) and internal bleeding (no red stuff). Both can be quite dangerous. Let's start with the external bleeding, as it is much easier to detect. Whenever dealing with blood think about SAFETY. The blood can bore many contagious diseases! Always wear some kind of protection (gloves are ideal, but plastic bags, condoms or the hand of the patient will do as well).

8. How do you stop external bleeding (when you have no access to a first aid kit)? Then describe how to construct a pressure dressing. [1,5 b]

The first thing you should try is to take the hand of the patient (if he is still able to cooperate and hold his hand in the wound) and try to compress the wound with his own hand. If this doesn't help, try it yourself with your hand.

The pressure dressing consists of something that covers the wound (ideally sterile), the pressure layer (bandage "roll"), which is then secured and pressed by a bandage wrapped around it (it should not be elastic bandage). You can also curl the bandage atop the pressure layer to increase the pressure. If the dressing is still leaking you can add to more "wrappings" after that, it is time for a tourniquet...

9. When is it appropriate to use a tourniquet? Where (along which bones) would you apply a tourniquet? [1 b]

You can apply a tourniquet along humerus and femur (you can press the artery against the bone).

The tourniquet is used when the third layer of pressure dressing is still leaking, if it is an amputation or if you have to solve the haemorrhage quickly (multiple patients...).

10. What are the symptoms of internal bleeding? [1 b]

The patient is pale, dizzy and has cold peripheries. His pulse is quick and shallow. He is weak, sleepy and possibly confused.

Nevertheless, the best clue is the incident mechanism – if there was a "blunt trauma" (fall, car crash...), it is quite likely that he is suffering from internal bleeding.

11. What is a hypovolemic shock? How would you treat a person in shock? (note we are discussing the circulatory shock). [1 b].

Hypovolemic shock means that the circulation is failing because there is not enough blood to circulate.

Treatment – lay the person down and elevate the legs (there is a lot of blood in them...). Keep the person warm and calm him down if necessary. Don't allow the person to eat, drink or take medication and wait for the ambulance.

The two last things that we are going to discuss in this assignment are stroke and allergic reactions. Starting with the latter – allergy is an overly aggressive reaction of an organism to a harmless (more or less) stimulus. The person can react by swelling (can obstruct airways...), coughing, rash... the most severe of these is a condition called anaphylactic shock.

12. What is an epi-pen and how does it work? [1 b]

Epipen is an autoinjector filled with adrenalin. It is applied to people with a severe allergic reaction. It is applied intramuscularly (into the middle of the thigh, don't forget to remove the pin).

Adrenalin works by centralizing the circulation (vasoconstriction) and increasing heart rate – stabilizing circulation.

13. What is a stroke? [1 b]

Stroke is ischemia of a part of the brain. It might be caused either by a blocked (eg. with a thrombus) vein or by a haemorrhage.

14. Decipher the acronym FAST, comment each point with one or two sentences. [1,5 b]

Face – look for asymmetry in the face (eyelids, tongue, mimics etc.). If one half seems paralyzed, there might be a problem.

Arm – also look for asymmetries in the upper limbs – can the person elevate both hands? Move both thumbs?

Speech – Does the person speak with you? Does it make sense? Is he oriented in space and time?

Time – act QUICKLY, you have about 3 hours to get the ischemia solved, or the person is facing severe consequences...

Now, with the acquired knowledge, you are going to try to solve some situations. When formulating the answer try to remember the SSS ABC algorithm and stick to it. Also, try not to forget simple things, such as sitting the person down or turning the stove off – I know it sounds trivial, but these are (sadly) quite essential... Good luck :)

15. Midsummer idyll, you are watching the birds and hearing the monotone sound of the chainsaw. Suddenly the deep hum changes and you hear your grandpa crying out loud and swearing like a drunken sailor. You run toward him and see him standing there looking at his forearm. There is a deep wound, blood squirts out of it in regular intervals, grandpa is turning pale. What are you going to do? [2 b]

Running there, I would take care of the chainsaw – I don't want it to chop off my leg as well. I see blood so either take precautions or just say it is your grandpa and you don't need to worry...

After that, I can see that grandpa is still standing, stimulate? Check.

Shouting for grandma to bring the first aid kit and call the ambulance I am approaching grandpa.

I am sitting him down (!) and using his fingers I press the wound. Does it work? Great, if not, I am sticking my fingers in there. Taking the first aid kit from grandma

I am constructing a pressure dressing and constantly watching grandpa I am waiting for the ambulance.

(if grandpa falls unconscious, I would check the breathing and alternatively begin with the CPR)

16. You are on a spring stroll with your best friend who is the mother of a charming 1-year old. You have stopped for a brunch and your friend is desperately trying to feed her daughter (who is fiercely opposing any form of cooperation and the vegetable puree is flying all around you). Suddenly, the little girl stops laughing. She is coughing, waving her little hands and quickly turning purple. What are you going to do? [2 b]

The situation is safe, the girl is still responding.

I am picking her up, then I am sitting down. With my leg slightly stretched I am positioning the little one so she is lying with her tummy on my forearm and her chin is in my hand where I can hold it. The forearm goes on my leg (it is stretched so the girl is tilted to the ground – gravity is working for me (by this time I am shouting at my friend to call the 155). Then I am trying the backstrokes (5x). That doesn't work, so I am "sandwiching" her between my forearms (my other hand holds the back of the head) and I turn her face up (placing the hand that is on her back on my other leg – I have her now lying with her bag on my other leg). I am doing something like CPR – with two fingers I am pressing sharply and deeply (5x) and repeating the process until she spits it out or the ambulance arrives (if she passes out – PCR).