

KOVY VÁZAJÍCÍ PROTEINY V ŽIVOČIŠNÝCH ORGANISMECH

Markéta Sztalmachová, Michal Masařík, Vojtěch Adam

I. ÚVOD

V poslední době se k nám ze všech stran dostávají různé informace o těžkých kovech. Co to vlastně jsou těžké kovy? Čím jsou tak nebezpečné? Troufám si říct, že se jedná o neviditelnou hrozbu naší generace, o látky, které na nás útočí ze všech stran. Jsou ve vzduchu, který je pro náš život nezbytný, najdeme je v potravě, bez které se neobejdeme, ale také v půdě, která je nezbytná pro růst rostlin, a tím silně ovlivňují celý potravní řetězec. Spousta z nás si ani neuvědomuje, že tyto látky přidáváme do potravin záměrně. Jedná se zejména o aromatické barvící, konzervační a emulgační látky, stabilizátory, ale také se přidávají do hnojiv a chemických postřiků a z nich přecházejí do rostlin a následně skončí opět u lidí, jako konečných spotřebitelů. Mnoho z nás si řekne, že takové množství přece nemůže být škodlivé, a to je právě ta skrytá hrozba těžkých kovů. Jejich významnou vlastností je schopnost akumulace v organismu a pomalé odbourávání. Dlouhodobý příjem v potravě nám tedy zaručí, že časem se u nás projeví následky vyvolané těmito látkami. Mezi nejčastější těžké kovy se řadí měď, kadmium, olovo, rtuť a mnoho dalších. Přestože se jedná o těžké kovy řada z nich plní v organismu důležité role a je pro život nepostradatelná. Tyto kovy se váží na proteiny a zapojují se do biochemických dějů, které v těle probíhají. Jedním z nejzávažnějších a nejčastějších problémů této doby jsou nádorová onemocnění. Čím je způsoben tak rychlý nástup a průběh onemocnění? Jak vzniká? Jak se proti tomu bránit? Takové a spoustu dalších otázek si pokládá mnoho z nás, ale kdo na ně zná odpověď? Vědci po celém světě se snaží přijít na odpovědi alespoň části z nich a najít úspěšnou léčbu. Jednou z možností je najít nové markery pro detekci nádorového onemocnění, a tím zajistit včasnou léčbu. Ve většině případů se těmi markery stanou právě proteiny, které mohou ve své molekule obsahovat těžké kovy.

II. LITERÁRNÍ PŘEHLED

Proteiny obsahující ve své molekule kov představují asi 40% ze všech proteinů a enzymů, vyskytujících se v živých organismech. (*Garcia, a kol., 2006, Gumulec*) Tyto proteiny jsou důležité pro mnohé metabolické procesy. V buňkách hrají důležitou roli také stopové prvky, které jsou nepostradatelné pro aktivaci a stabilizaci enzymů. Řadí se sem převážně přechodné kovy s malými atomovými poloměry, jako jsou Zn, Cu, Mn, Fe. Ionty kovů hrají důležitou roli v celé řadě funkcí, jako jsou stabilita, signalizace, konformační změny a katalýza. Přítomnost kovů má zásadní význam pro konformaci až ve třetině všech proteinů. (*Garcia, a kol., 2006*) Nepřítomnost esenciálních kovů v organismu může mít za následek řadu onemocnění. Naopak zvýší-li se množství kovu v organismu nad fyziologickou hranici, například pozřením kovového předmětu, dochází k toxicitě. (*Cummings a Kovacic, 2009*)

1.1 Zinek

1.1.1 Fyzikální a chemické vlastnosti zinku

Zinek je lesklý modrobílý kov za normální teploty křehký, jehož atomové číslo je 30. (*Cummings a Kovacic, 2009*) Radíme ho do II. B skupiny a má oxidační číslo II. Jelikož je na vzduchu rychle pokryt tenkou vrstvou oxidu, je na vzduchu stálý. Je rozpustný v silných minerálních kyselinách za současného uvolnění vodíku, v roztocích hydroxidů, vodném amoniaku a za tepla i v chloridu amonném. Na vzduchu při zahřátí hoří modrozeleným plamenem za vzniku oxidu zinečnatého. Za vyšších teplot je těkavý. S mnoha kovy je neomezeně mísitelný a tvoří s nimi řadu slitin. (*Vacík, 1999*) V biologickém materiálu byl zinek dříve stanovován spektrofotometricky, polarograficky a spektrograficky. Dnes se přednostně užívá atomová absorpční spektrofotometrie. Dalšími použitelnými metodami jsou emisní spektrografie a neutronová aktivační analýza. (*Bencko, 1995*)

1.1.2 Význam zinku

Zinek je jedním z nejdůležitějších stopových prvků v těle. Je zásadní jako katalyzátor, strukturální i regulační iont. (*Dastych*) Je nezbytný pro buněčné proliferace a diferenciaci. Dále je důležitý pro správný růst a vývoj v těhotenství, v dětství a v dospívání. Nachází se ve všech tělesných tkáních a tekutinách v poměrně vysokých koncentracích. V krvi se váží zinečnaté ionty hlavně na albumin a α -2 makroglobulin, v buňkách na proteiny a peptidy. (*Gumulec*) Pět a osmdesát procent se zinku v těle se nachází ve svalech a kostech, 11% je v kůži a v játrech a zbytek je lokalizován v ostatních tkáních. Zinek se vyskytuje u mnohobuněčných organismů jako intracelulární, kdy se 40% nachází v jádře buňky, 50% v cytoplasmě a organelách a zbytek se nachází v buněčné membráně. (*Stefanidou, a kol., 2006*) Zinek je základním prvkem hormonu brzlíku zvaného thymulin, který je potřebný pro zrání T-lymfocytů a jejich diferenciaci. Také se zapojuje do homeostázy, imunitní odpovědi, apoptózy, stárnutí a je také důležitým antioxidantem, který přímo chrání lipidy i proteiny. Jednou z jeho dalších funkcí je ochrana buněk před toxickými vlivy iontů kovů jako je Fe, Hg, Cu a Cd. Zinek zabraňuje stárnutí buněk a snižuje relaps infekce. (*Stefanidou, a kol., 2006*)

Zinek je strukturální složkou řady enzymů, proteinů a transkripčních faktorů. Zastává strukturální roli v ribozomech, nukleových kyselinách a buněčných membránách. Je zapojen do procesů genetické stability a genové exprese, do replikace DNA, transkripce RNA a programované buněčné smrti. Je velmi důležitý pro správnou strukturu mnoha enzymů. Navázáním se na menší proteiny stabilizuje jejich terciární konformaci, a tím pomáhá udržet jejich funkci. (*Cummings a Kovacic, 2009*) Hraje také velmi důležitou roli v metabolismu inzulínu, kdy se jeden atom zinku váže na dvě molekuly inzulínu. Takto vytvořený dimer se ukládá v Langerhansových ostrůvcích. Bylo prokázáno, že tento kov je tedy nezbytný pro syntézu, akumulaci, uvolnění a také pro inhibici inzulínu. (*Tubek, 2006*) Zinečnaté ionty se váží na řadu struktur buďto pevně (cca 90%), nebo s nízkou afinitou (cca 10%). (*Tubek, 2006*) Pevně se váží na metaloproteiny, nukleoproteiny a metaloenzymy, a tak tvoří nemobilní zásobu zinečnatých iontů. Nízkou afinitou jsou tyto ionty vázány na sloučeniny s nízkou molekulovou

hmotností, a to na metalothionein, AMK (cystein, prolin, histidin) a organické kyseliny. (*Gumulec*) Pro svou činnost vyžaduje zinek více než 200 metaloenzymů, včetně karboxypeptidázy A, alkalické fosfatázy, karboanhydrázy, enzymů bílkovin, lipidů a sacharidů. Při katalytických reakcích se přímo váže s molekulami substrátu. Tato vazebná místa jsou velmi stabilní, a tím i méně přístupná. Zastupuje také důležitou roli při regulaci a syntéze enzymů, tudíž i určuje jejich koncentraci. (*Cummings a Kovacic, 2009, Studnickova, a kol., 1997*)

Zinek se hojně vyskytuje v měkkých, zejména v ústřicích, v mase (více zinku obsahuje tmavé maso), v játrech, v rybách, v mléčných výrobcích a také ve vejcích. Z rostlinných zdrojů jde především o semena, ořechy, obiloviny, luštěniny a sojové výrobky. Nejvíce je však přítomen v živočišné stravě, což znamená, že u vegetariánů mohou nastat stavy spojené s deficitem zinku. (*Cummings a Kovacic, 2009, Hess, a kol., 2009*)

Doporučená denní potřeba zinku je stanovena vyhláškou ČR na 10 mg a maximální přípustná hranice je stanovena na 25 mg. Uvádí se, že u dětí do 8 let by měla být denní dávka 5mg, pro děti 8-10 let je stanoveno 10mg, pro ženy je to 12 mg a pro muže či těhotné ženy je stanovena dávka 15mg. (*Underwood, 1981*) Doporučené denní dávky zinku pro hospodářská zvířata jsou uvedeny dále (Tabulka č. 1). Zinek se v těle neukládá a nadbytek příjmu vede ke zvýšenému vylučování z těla. Avšak existují případy akutní či chronické otravy zinkem. (*Stefanidou, a kol., 2006*) Příznaky nedostatku či toxicity je uveden v kapitolách „Nedostatek zinku“ (2.3) a „Toxicita“ (2.4).

Tabulka č. 1: Doporučené dávkování zinku pro hospodářská zvířata (2003)

kategorie zvířat	mg/kg sušiny
tele	28-34
jalovice	25-50
březí jalovice	20-31
kráva (40 kg mléka/den)	47-63
březí kráva	14-23
býk	17-35
ovce	20-39
jehně	24-49
koza	10-80
kanec	50
prasnice	50
sele	50-100
kůň	40-50

1.1.3 Metabolismus zinku

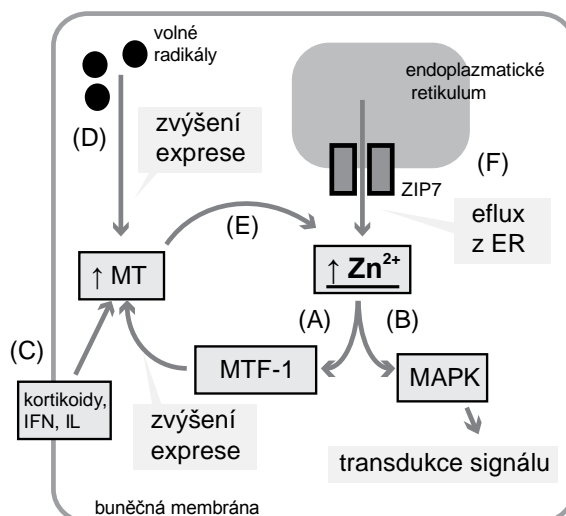
K resorpci zinku dochází převážně v tenkém střevě, v menší míře také v žaludku a tlustém střevě. Během trávení může zinek tvořit komplexy s různými ligandy, jako jsou AMK, fosfáty či jiné organické kyseliny. Mezi nejčastější aminokyselinové ligandy řadíme histidin, cystein a methionin. Resorpce zinku je snížena s přítomností fyátů či nadbytkem Cu, Fe a Cd. Ty na sebe zinek naváží, a tím sníží jeho resorpci. Fyáty se hojně vyskytují v obilovinách a luštěninách, přesto jsou stále dobrým zdrojem. (2003) Dále snižuje resorpci také přítomnost sacharidů. Resorpce je zajištěna difuzí a také cestou specifických ligandů, jako je cystein, histidin a prostaglandiny, které umožňují vstup zinku do střevních buněk. Jakmile tento kov prostoupí do buňky je navázán na metalothionein (MT), protein který zajišťuje homeostázu jeho transportu do

krevního oběhu (*Pechová A.*). Syntézu MT stimuluje vysoký obsah zinku. (*Olafson, 1988*) Většina kovu zůstává navázána na MT a je po odloupení buněk vylučována. Celkový obsah zinku v těle je tedy ovlivňován resorpcí ve střevě, ale také exkrecí endogenního zinku. (*Pechová A.*) Zinek je vylučován převážně stolicí jako nevstřebaný nebo endogenní zinek. (*2003*) Další způsob detoxikace probíhá v ledvinách, kdy se Zn^{2+} navázány na MT detoxikují v ledvinách a jsou poté vyloučeny močí. (*Gumulec*)

Homeostatická regulace množství zinku v těle je na několika úrovních: sekrece do střeva, absorpce ze střeva, vylučování zinku, uvolňování ze svalů, srdce a kůže a nakonec výměna zinku s erytrocyty a játry. Primárním mechanismem je střevní absorpce a následné vyloučení výkaly, čímž se zvyšuje riziko nedostatku v těle. (*Cummings a Kovacic, 2009*) Regulace intracelulární hladiny zinku je zajišťována intracelulárními zinečnatými ionty, které váží proteiny a dále také zinkovými transportéry. Klíčovým regulátorem je kov-regulační transkripční faktor 1 (MTF-1), který ovlivňuje transkripci genů účastnících se regulace hladiny tohoto kovu. (Obrázek č. 1) Tímto ovlivňuje udržování stálé koncentrace zinku v buňkách a to tak, že ovlivňuje expresi metalothioneinů a zinkových transportérů, které jsou zodpovědné za aktivní přenos Zn^{2+} . (*Gumulec*)

Bylo zjištěno, že volná intracelulární frakce Zn^{2+} má proměnlivou hladinu, která se může zvýšit vlivem volných radikálů. Tyto radikály způsobí uvolnění iontů zinku z vazby do intracelulárního prostředí. (*Gumulec*) Koncentrace volných iontů může být také zvýšena uvolněním z endoplazmatického retikula nebo Golgiho aparátu. Takto uvolněný zinečnatý iont může být poté zapojen do řady signálních a regulačních kaskád a může také inhibovat funkci protein tyrozin fosfatáz, které zodpovídají za buněčnou diferenciaci. Podobným způsobem mohou být aktivovány mitogen- aktivované proteinové kinázy, které se účastní mitózy, buněčné diferenciaci, přežití buněk, apoptózy či genové exprese. (*Gumulec*)

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



Obrázek č. 1: Účinky zinečnatých iontů. Převzato z (Gumulec): Zvýšením množství Zn^{2+} (A) se prostřednictvím MTF-1 zvýší exprese MT. Zvýšení exprese MT je též způsobeno interleukiny (IL), interferony (IFN) či kortikoidy (C) a také volnými radikály (D). Zvýšením hladiny MT dojde ke zvýšení hladiny Zn^{2+} (E). Z endoplazmatického retikula se pomocí transportéru ZIP7 přenášejí Zn^{2+} do cytoplasmy (F)

1.2 Nedostatek zinku

V mnoha zemích existují půdy, které jsou deficitní na zinek. Aby rostliny obsahovaly vyšší množství tohoto prvku, používají se zinková hnojiva. Aplikace těchto hnojiv způsobí zvýšení koncentrace zinku v píce a obilí, a tím se sníží riziko projevů nedostatku zinku u zvířat. (Underwood, 1981)

Zinkový deficit se nevyskytuje u drůbeže a prasat, která jsou krmena komerčními krmivy s obsahem živočišných bílkoviny, jako je masová moučka, rybí moučka a kasein. Krmiva obsahující rostlinné proteiny, např. sója, lupina, sezamové semínko, a bavlníkové semeno, nemohou spolehlivě zajistit dostatečný přísun, protože chelatační účinky těchto krmiv zvyšují nároky na zinek. (Underwood, 1981)

Nedostatek zinku v těle se projevuje zpomalením růstu, nechutenstvím, dermatitidou, zhoršeným stavem srsti či peří, onemocněním gastrointestinálního traktu, nemocemi jater, AIDS, zhoršeným hojením ran, poruchami vývoje či poruchami reprodukce. (2003) Nedostatek má také vliv na metabolismus vitamínu A. Zdá se, že snížená hodnota tohoto prvku v těle snižuje syntézu retinol-vázajícího proteinu (RBP- retinol binding protein), který je dopravcem vitamínu A z jater do krve. (Underwood, 1981) Dále deficit způsobuje zvětšení nadledvinek, a tím i zvýšenou produkci glukokortikoidů, což vede k atrofii brzlíku s následnou sníženou humorální imunitou. (2003) Nedostatek nepříznivě působí i na spermatogenezi samců a u samic na rozvoj pohlavních orgánů, negativně ovlivňuje reprodukční proces od říje až po porod a laktaci. U ptáků často dochází k deformacím kostry. Inhibice růstu je způsobená částečně sníženým příjmem krmiva důsledkem inapetence a částečně zhoršeným využitím krmiva. (Underwood, 1981) Všechny tyto příznaky jsou zapříčiněny zpomalením syntézy DNA a RNA, a tím tedy i celkovým zpomalením buněčné proliferace a diferenciací. (Cummings a Kovacic, 2009)

Nedostatek může být způsoben malým přísunem zinku v potravě nebo inhibicí některými faktory, např. fytyáty, které na sebe zinek váží, a tím brání jeho vstřebávání. (2003) Dále sem řadíme např. šřavelany, Fe, Cu, a Ca, nebo mohou být příčinou také metabolická onemocnění, zvýšené ztráty či zvýšené požadavky zinku. (Cummings a Kovacic, 2009) Kromě deficitu zinku v těle vlivem předchozích způsobů jsou známy také dva genetické defekty metabolismu zinku, a to „letal milk syndrom“ a tzv. adema. V prvním případě se jedná o nemoc, kdy je v mateřském mléce kriticky nízká koncentrace zinku, což má za následek smrt mláďat. Nemoc známá jako adema je dědičný defekt absorpce zinku ve střevě. (Dastych)

Funkční i strukturální abnormality nedostatku jsou spojené s širokou škálou změn v krvi a tkáních. U jater, ledvin, srdce, kostí a svalů je pokles zinku menší, zato v plasmě, ve slinivce břišní, ve vlasech, ve vlně a v peří je pokles výrazný. K diagnóze nedostatku se nejčastěji používá stanovení zinku v krevní plasmě a krevním séru. Dále se zinek stanovuje v srsti a ve vlně. Všechna tato stanovení jsou ovšem ovlivněna stresem, potravou, ročním obdobím, věkem a částí těla. (Underwood, 1981)

1.3 Toxicita

Pro živé organismy je zinek prakticky netoxický, nemá karcinogenní, mutagenní ani teratogenní účinky. (Cahill-Morasco a DePasquale, 2002) Prasata, ovce, drůbež i skot vykazují značnou toleranci k vyššímu příjmu zinku. (Pritchard, a kol., 1985) Rozsah tolerance je závislý na živočišném druhu, převážně však na potravě a relativním obsahu Ca, Cu, Fe a Cd v ní obsažených. (Underwood, 1981) Přebytek má za následek snížené vstřebávání a jeho zvýšené vylučování. Vylučuje se především stolicí, pankreatickou šťávou, močí, žlučí a také slinami. (Cahill-Morasco a DePasquale, 2002) I přesto se objevují zmínky o akutní či chronické otravě zinkem. (Stefanidou, a kol., 2006) Zinek se po požití postupně uvolňuje v kyselém prostředí žaludku a dráždí sliznice a vředy a následně je vstřebán do krevního oběhu, kde se váže na bílkoviny, převážně na albumin a β 2- makroglobulin. (Cahill-Morasco a DePasquale, 2002, Cummings a Kovacic, 2009) Dále se zinek hromadí v tkáních, např. v játrech, ledvinách, prostatě, slinivce břišní, ve svalech a v kostech. (Cahill-Morasco a DePasquale, 2002)

1.3.1 Akutní toxicita

Bylo popsáno několik případů otravy krmivem, které bylo skladováno v pozinkovaných kontejnerech. Nepříznivé účinky byly pozorovány také v případě vdechování kouře oxidu zinku nebo při náhodném požití kovu. Nepříznivé důsledky akutní otravy by neměly mít dlouhodobé trvání. (<http://ods.od.nih.gov/>, Stefanidou, a kol., 2006)

1.3.2 Chronická a subchronická toxicita

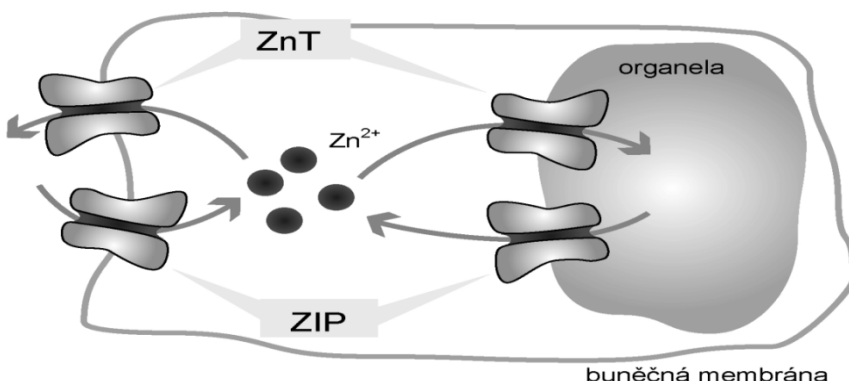
Dlouhodobý příjem stravy obsahující zinek v rozmezí 50-300 mg/den jsou spojeny s leukopenií, neutropenií, anémií, hemoglobinurií, proteinurií, sníženou koncentrací a činností enzymů obsahujících Cu, poruchami metabolismu lipoproteinů a s celkovým narušením imunitního

systemu. Dále dochází ke zvýšení hladin amylázy, lipázy, močoviny, kreatininu a jaterních enzymů. (Cummings a Kovacic, 2009, Stefanidou, a kol., 2006) Mezi další projevy intoxikace patří zvracení, letargie, inapetance a průjem. (Cummings a Kovacic, 2009) Klinické příznaky se stupňují dle trvání a síly otravy. Počátečními příznaky jsou nechutenství a zvracení, následně změna barvy moči a zápach z ústní dutiny. Po dlouhodobějším působení zaznamenáváme ikterus, kulhání, polyurii, exoftalmus, záchvaty a někdy i srdeční šelesty v důsledku anémie. Z výše vyjmenovaných příznaků se nejčastěji objevuje anémie, kdy dochází k inhibici červených krvinek, jejich výroby a funkce. Vzhledem k tomu, že zinek ovlivňuje metabolismus jiných kovů (Fe, Cu) má také negativní dopad na celkovou krvetvorbu. (Cummings a Kovacic, 2009)

1.4 Proteiny vázající zinek

1.4.1 Zinkové přenašeče

Jak již bylo popsáno výše, zinkové přenašeče regulují intracelulární hladinu zinečnatých iontů. Za přenos těchto iontů přes membrány zodpovídají dvě rodiny transportérů, a to rodina ZIP-proteinů a rodina ZnT-proteinů. (Obrázek č. 2) ZIP-proteiny mají za úkol přenos iontů z extracelulárního prostředí a organel do cytoplasmy. ZnT-proteiny naopak zodpovídají za přesun iontů z cytoplasmy do extracelulárního prostředí a organel. Je potvrzeno, že tyto transportéry jsou schopné přenášet i jiné kovy, např. Fe, Cu, Ni, Cd a Co. Tyto kovy mohou působit inhibičně na přenos Zn^{2+} , a to buď přímo inhibicí, nebo pouze navázáním se na vazebná místa určená pro zinečnaté ionty. (Gumulec)



Obrázek č. 2: Schéma transmembránového přenosu Zn^{2+} . Převzato z (Gumulec): ZnT-proteiny přenášejí Zn^{2+} z cytoplasmy do organel a extracelulárního prostředí. Naopak ZIP-proteiny zodpovídají za přenos Zn^{2+} z extracelulárního prostředí a organel do cytoplasmy.

1.4.1.1 Rodina ZIP-proteinů

Jedná se o přenašeče zodpovědné za přenos iontů z extracelulárního prostředí a organel do cytoplasmy. Bylo popsáno 14 podtypů těchto transportérů (Tabulka č. 2). Tyto přenašeče mají osm transmembránových jednotek, mezi 3. a 4. jednotkou je smyčka bohatá na histidin, která je nejspíš zodpovědná za vazbu kovů. Bylo zjištěno, že pro správnou funkci těchto transportérů je nezbytný transmembránový gradient HCO_3^- . Přenašeče rodiny ZIP nejsou závislé na energii. Při nedostatku zinečnatých iontů se zvyšuje exprese některých transportérů z této rodiny. Pokud je iontů nadbytek dojde k inaktivaci přenašečů, a následně dochází k degradaci ve vakuolách. (Gumulec)

Tabulka č. 2: Přehled rodiny ZIP proteinů. Upraveno dle (Gumulec)

přenašeč	tkáňová lokalizace	buněčná lokalizace	fuknce
hZIP1	všudypřítomný	plazmatická membrána	vychytávání Zn
hZIP2	děloha, prostata, monocyty	plazmatická membrána	vychytávání Zn
hZIP3	všudypřítomný	plazmatická membrána	vychytávání Zn
hZIP4	GIT, ledviny	apikální membrána enterocytů	vychytávání Zn
ZIP5	játra, ledviny, GIT, slezina	bazolaterální membrána buněk	vychytávání Zn
ZIP6	všudypřítomný	plazmatická membrána	vychytávání Zn
ZIP7	všudypřítomný	ER, Golgiho aparát	transport Zn z organel do cytosolu
ZIP8	všudypřítomný	vezikuly, plazm. membrána, mitochondrie	vychytávání Zn, Cd, Mn
ZIP9	všudypřítomný	neznámá	neznámá
ZIP10	všudypřítomný	plazmatická membrána	vychytávání Zn
ZIP11	všudypřítomný	neznámá	neznámá
ZIP12	mozek, varlata, plíce, sítnice	plazmatická membrána	vychytávání Zn
ZIP13	všudypřítomný	Golgiho aparát	transport Zn z organel do cytosolu
ZIP14	všudypřítomný	plazmatická membrána	vychytávání Zn, Fe

1.4.1.2 Rodina ZnT- proteinů

Jedná se o přenašeče iontů z cytoplasmy do organel a extracelulárního prostředí, čímž chrání buňky před toxickými hladinami zinečnatých iontů. Je známo devět transportérů této rodiny, které byly pojmenovány zinečnaté transportéry (ZnT) 1-9 (Tabulka č. 3). Mají mezi 4. a 5. transmembránovou doménou smyčku bohatou na histidin. Přesný mechanismus transportu není přesně znám, ale předpokládá se, že je založen na antiportním mechanismu zinečnatých iontů s K^+ nebo H^+ . Oproti ZIP přenašečům vysoká hladina zinečnatých iontů zvyšuje jejich expresi. (Gumulec)

Tabulka č. 3: Přehled rodiny ZnT- proteinů. Upraveno dle (Gumulec)

přenašeč	tkáňová lokalizace	buněčná lokalizace	funkce
ZnT-1	všudypřítomný	plazmatická membrána	odstraňování Zn z cytoplazmy
ZnT-2	tenké střevo, ledviny, varlata, placenta, prostat, prsní žláza	endozomy	transport Zn do vezikul a lysozomů
ZnT-3	mozek, varlata	synaptické vezikuly	transport Zn do synaptických vezikul
ZnT-4	všudypřítomný, hlavně prsní žláza	endozomy, Golgiho aparát	transport Zn do vezikul, mléka
ZnT-5	všudypřítomný	Golgiho aparát, insulinová granula	transport Zn do organel
ZnT-6	tenké střevo, játra, mozek	Golgiho aparát	Transport Zn do Golgiho aparátu
ZnT-7	všudypřítomný	Golgiho aparát	Transport Zn do Golgiho aparátu
ZnT-8	pankreas	insulinová granula	transport Zn
ZnT-9	všudypřítomný	plazmatická membrána, jádro	neznámá

1.4.2 Matrixové metaloproteinázy

Matrixové metaloproteinázy (MMP) jsou skupinou zinek-dependentních proteinů, které mají za úkol štěpení součástí pojivové tkáně, jako je kolagen, elastin, želatina a kasein. Buňky pojivových tkání jsou obklopeny extracelulární hmotou, mezi jejíž funkce patří udržování trojrozměrného tvaru, slouží při organizaci a diferenciaci buněk, je potřebná pro výměnu informací a také jako bariéra proti mikroorganismům. MMP se vyskytují jak u bezobratlých živočichů, obratlovců tak i u rostlin. (Zitka, a kol.) Metaloproteinázy tvoří početnou rodinu více než 20 enzymů, které mají různé názvy (gelatinázy, elastázy, kolagenázy, matrilysin). Nově se označují také čísla MMP1-MMP28. (Tabulka č. 4). (Zitka, a kol.) Metaloproteinázy jsou ve zdravé tkáni produkovány jen ve velmi malém množství, vznikají hlavně ve fibroblastech jako odpověď na nádorové bujení, nebo mohou být produkovány přímo nádorovými buňkami. Za fyziologického pH jsou tyto enzymy schopny štěpit většinu proteinů. (Egeblad a Werb, 2002) V současné době je známo 6 tříd MMP (kolagenázy, želatinázy, stromelysiny, matrilysiny,

membránové metaloproteinázy a jiné MMP). (Zitka, a kol.) MMP ve svém aktivním místě vážou zinek, který je nezbytný pro funkci enzymu. MMP se dělí na metaloendopeptidázy a metalokarboxypeptidázy. (Zitka, a kol.) Jak již bylo zmíněno výše matrixové metaloproteinázy degradují extracelulární hmotu a až na výjimky mají širokou substrátovou specifitu. (Zitka, a kol.)

Tabulka č. 4: Přehled metaloproteináz. Upraveno dle (Zitka, a kol.)

Název enzymu	Číslo	Mol. hmotnost aktivního enzymu (kDa)	Substrát
intersticiální kolagenáza	MMP-1	43	kolagen I, II, III, VIII, X, želatina, proteoglykan, selektin, ovostatin
želatináza A	MMP-2	66	kolagen I, IV, V, VII, X, XI, XIV, želatina, elastin, fibronectin, laminin
stromelysin 1	MMP-3	46	kolagen III, IV, V, IX, želatina, elastin, kasein, laminin, agrekan, ovostatin
matrilysin	MMP-7	20	kolagen IV, X, želatina, agrekan, fibronectin, laminin, alestin, kasein, transferin
neutrofilová kolagenáza	MMP-8	58	kolagen I, II, III, V, VII, VIII, X, želatina, agrekan, fibronectin
želatináza B	MMP-9	92	želatina, kolagen IV, V, VII, X, XI, elastin, fibronectin, agrekan, plasminogen
stromelysin 2	MMP-10	46	kolagen III, IV, V, želatina, kasein, agrekan, alestin
stromelysin 3	MMP-11	44	kasein
makrofágová elastáza	MMP-12	45	elastin, kasein, želatina, kolagen IV, fibronectin, laminin, fibrin, fibrinogen, plasminogen
kolagenáza 3	MMP-13	55	kolagen I, II, III, IV, IX, X, XIV, želatina, plasminogen, agrekan, fibronectin,
MT1-MMP	MMP-14	54	kolagen I, II, III, želatina, kasein, fibronectin, laminin, proteoglykany
MT2-MMP	MMP-15	61	fibronectin, laminin, perlekan
MT3-MMP	MMP-16	55	kolagen III, želatina, kasein, fibronectin
MT4-MMP	MMP-17	54	neznámý

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

klagenáza 4	MMP-18		kolagen I, II, III, VIII, X, želatina, agrekan
RASI-1	MMP-19		želatina, agrekan, fibronectin
enamelysin	MMP-20		amelogrenein, agrekan
	MMP-21		neznámý
	MMP-22		neznámý
	MMP-23		neznámý
MT5-MMP	MMP-24		neznámý
MT6-MMP, leukolysin	MMP-25		proželatináza A, fibrin, fibronectin, kolagen IV, želatina
matrilysin-2, endometáza	MMP-26		želatina I α , fibrinogen, fibronectin
epilysin	MMP-28		kasein

1.4.2.1 Struktura

MMP obsahují ve své struktuře zinek a vápník- dependentní endopeptidázy, které jsou syntetizovány jako zymogeny. Tyto neaktivní formy zabraňují štěpení esenciálních složek buňky. MMP jsou tedy z buňky většinou vylučovány jako neaktivní proenzymy, kromě membránově vázaných MMP. Struktura molekuly proenzymu se dělí do tří domén (N-terminální propeptid, katalytická doména a C-terminální část). (*Zitka, a kol.*)

N-terminální propeptid obsahuje zhruba 80 AMK, ze kterých má nejvýznamnější roli cystein, jehož postranní řetězce reagují s katalytickým zinkovým atomem a vytváří tzv. cysteinové sepnutí. (*Zitka, a kol.*) Propeptid obsahuje konzervativní sekvence (ProArg-Cys-Gly-X-Pro-Asp) a po jejím odstranění dojde k aktivaci zymogenu. (*Zitka, a kol.*)

Katalytická doména je složena z pětiramenného β - listu, tří α -helixů a ze spojovacích smyček. Tvoří ji 170 AMK a obsahuje zinek-vazebný motiv (His-Glu-XX-His-XX-Gly-XX-His) s pevně vázaným methioninem, který vytváří strukturu zvanou methioninový ohyb. Dále obsahuje 2 zinečnaté kationty a 2-3 kationty vápenaté. (*Zitka, a kol.*)

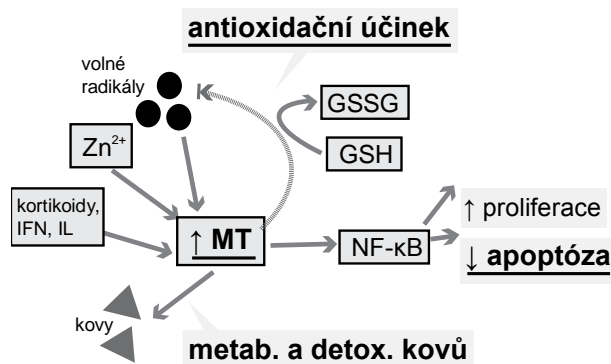
C-terminální doména má velký povrch pro interakce s jinými proteiny. Má tvar elipsoidního disku se 4 listovými β -strukturami, připomínající čtyřlístek. Každý list je složen ze 4 antiparalelních β -pramenů a α -helixů. První a čtvrtý list je spojen disulfidickým můstkem.

Katalytická a C-terminální doména jsou spojeny závěsem, který má variabilní délku. Přesná funkce tohoto závěsu není zcela objasněna. (Zitka, a kol.)

Katalytická doména chybí u matrilysinů, a to způsobuje, že jsou jedny z nejmenších molekul MMP. U skupiny transmembránových matrixových metaloproteináz se navíc nachází doména transmembránová, která je schopna enzym navázat na povrch buňky. Tuto doménu tvoří hydrofobní řetězec s 25 AMK. (Sztalmachova, 2011) (Zitka, a kol.)

1.4.3 Metalothionein (MT)

Metalothioneiny představují skupiny intracelulárních proteinů s velkým obsahem cysteinových AMK, které jim díky thiolovým vazbám mezi cysteiny dávají schopnost vázat kovy. (Krizkova, a kol., 2009) Díky této schopnosti hrají důležitou roli v přenosu těžkých kovů, jejich detoxikaci a při ochraně buněk před oxidativním stresem. (Obrázek č. 3) Kovy se na MT naváží a jsou transportovány do ledvin a odtud pak vyloučeny. Metalothionein slouží pro homeostatickou kontrolu zinku. Jedna molekula MT je schopna navázat 7 dvojmocných zinečnatých iontů nebo 12 iontů jednomocných. (Fabrik, Lansdown, a kol., 2007, Stefanidou, a kol., 2006) Metalothioneiny se vyskytují prakticky ve všech živých organismech. Mají vysokou afinitu k zinku, což je důležité v boji proti oxidačnímu stresu a při imunitní reakci. Antioxidační působení je podmíněno přítomností cysteinových AMK v jeho řetězci, které obsahují volnou thiolovou skupinu -SH. (Lansdown, a kol., 2007) To umožní metalothioneinu se vázat s glutathionem (GSH), a tak snižovat hladinu volných kyslíkových radikálů nebo těžkých kovů. Tímto vytvoří redukční prostředí a chrání nukleové kyseliny, fosfolipidové membrány a proteinové aparáty buňky před ionizujícím zářením a oxidačním působením toxických činidel. (Fabrik) Hladina MT stoupá v situacích s vyšším rizikem intoxikace těžkými kovy. Jeho funkce zasahuje také do regulace apoptózy- buněčné smrti, a to tím, že zvýšená hladina MT má antiapoptické působení. (Lansdown, a kol., 2007, Stefanidou, a kol., 2006)

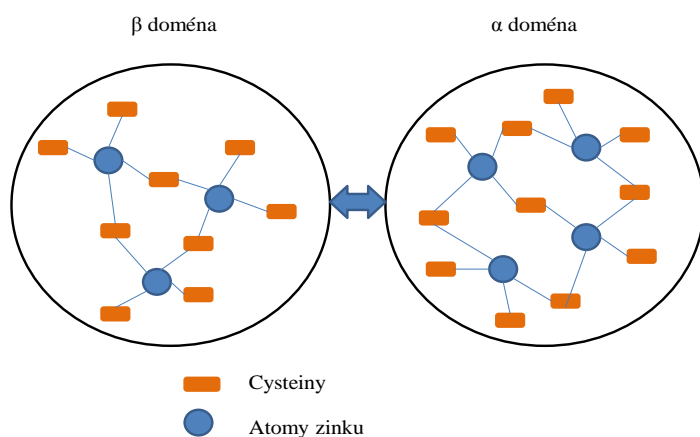


Obrázek č. 3: Působení metalothioneinu. Převzato z (Gumulec): Vlivem volných radikálů, Zn^{2+} a dalších vlivů dochází ke zvýšení hladiny MT. Spolu s GSH působí MT na tyto volné radikály jako antioxidanty. Další funkcí MT je antiapoptické působení a detoxikace těžkých kovů.

Expresi MT a zinkových transportérů ovlivňuje kov-regulační transkripční faktor 1 (MTF-1, metal regulatory transcription factor 1). Ovlivňuje transkripci řady genů, které se účastní regulace hladiny Zn^{2+} . (Fabrik, Gumulec) Jako zásobník zinku může MT přenášet kovy na transkripční faktory a tak je aktivovat. Takto aktivované transkripční faktory se váží na regulační sekvence DNA a spouští transkripci. (Fabrik) Některé studie poukazují na zvýšení hladiny MT u nádorových onemocnění. Předpokládá se, že právě zvýšená hladina MT je zodpovědná za ochranu nádorových buněk před apoptózou. (Gumulec)

U MT jsou známy 4 funkční geny: MT-1, MT-2, MT-3 a MT-4. (Krizkova, a kol., 2009) Všechny tyto geny leží u člověka na chromozomu 16. (Mocchegiani a Malavolta, 2008) MT-1 proteiny byly prokázány u všech savců a u některých bezobratlých. MT-2 se nacházejí u prvků, sinic, kvasinek, některých bezobratlých a u savců. MT-3 se nachází v rostlinách, některých houbách a u savců. Je lokalizován v oblasti mozku. MT-4 se vyskytuje ve sliznici ústní dutiny, jícnu a horní části břišní dutiny. MT-1 i MT-3 se nachází v játrech a byla prokázána jejich detoxikační funkce těžkých kovů a regulace Zn a Cu. MT-2 se nachází převážně v játrech. (Mocchegiani a Malavolta, 2008, Tapiero a Tew, 2003)

Řetězec MT je složen z cca 60 AMK a v jeho molekule nejsou přítomny žádné aromatické AMK. Díky rentgenové krystalografické strukturní analýze bylo zjištěno, že molekula MT je složena ze dvou domén o přibližně stejné velikosti. Jedná se o α a β doménu, které jsou složeny z cysteinových klastrů. (obrázek č. 4) Sulfhydrylové zbytky cysteinů se účastní kovalentní vazby kovů. β -doména, značená také jako N-terminální část peptidu má tři vazebná místa pro dvojmocné ionty. α -doména neboli C-terminální část je schopna vázat čtyři dvojmocné ionty kovů. Pokud se jedná o jednomocné ionty kovů, je pak MT schopen navázat až 12 atomů. Domény se od sebe liší afinitou ke kovům a stabilitou. β -doména je méně stabilní vůči alkylačním a chelatačním činidlům, které působí na -SH skupiny. U α -domény klesá afinita k iontům kovů v pořadí Cd-Zn-Cu, a u β -domény klesá v pořadí Cu-Zn-Cd. (Fabrik) V nedávno publikované studii bylo zjištěno, že MT má tři odlišné třídy vazebných míst s různou afinitou k Zn. (Krezel a Maret, 2007)



Obrázek č. 4: Struktura metalothioneinu. Upraveno dle (Fabrik) Molekula MT se skládá ze dvou domén (α -doména a β -doména). Oranžovou barvou jsou vyznačeny cysteiny s -SH skupinami, na které se váží Zn^{2+} (modře).

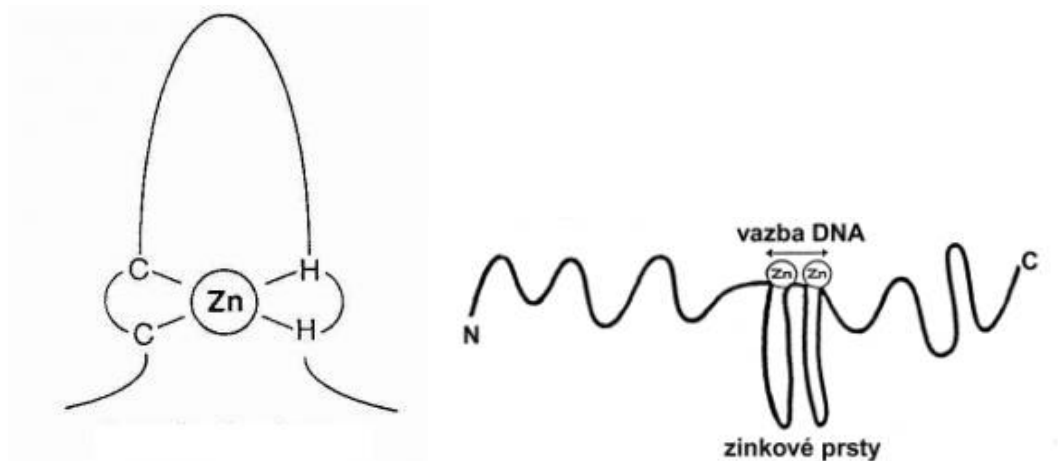
Biosyntéza MT je ovlivněna ionty kovů, hormony, cytosiny, růstovými faktory, nádorovými promotory, ale také chemikáliemi a jinými látkami. (*Krezel a Maret, 2007*) Velký nárůst MT je pozorován také v játrech zvířat při působení stresových faktorů. Za fyziologických podmínek se jeho hladina zvyšuje při buněčné proliferaci. Metalothionein si vyměňuje Zn^{2+} s proteiny zinkových prstů a tak se podílí na procesech zapojených do genové exprese. (*Piotrowski a Mogilnicka, 1976*)

2.4.4 Zinkové prsty

Zinkové prsty (ZF) jsou proteiny obsahující pravidelně rozmístěné cysteinové a histidinové zbytky koordinované k zinku. Každý prst je složen z antiparalelní β -struktury, zinku a α -helixu, který se ve větším žlábků váže na DNA. (*Klug, 2005*) Díky zinku se u proteinů zvýší jejich tepelná a konformační stabilita. Zinkové prsty obsahují kolem 30 AMK. (*Babu, a kol., 2006, Fu, a kol., 2009*) ZF patří mezi proteiny, které mají širokou škálu funkcí v buněčných procesech, jako jsou replikace, transkripce, metabolismus, ale také buněčná proliferace a apoptóza. Zinkové prsty se váží na celou řadu sloučenin, např. nukleové kyseliny, bílkoviny a různé malé molekuly. Na základě prostorové struktury dělíme ZF do několika skupin. (*Giesecke, a kol., 2006, Krishna, 2002*) Skupiny jsou rozděleny podle struktury a často spolu souvisí i funkčně. I přes strukturální a funkční podobnosti v jedné skupině spolu ZF nemusejí souviset evolučně. (*Bittel, a kol., 2000*) Většina ZF patří do skupin C2H2 (což je klasický zinkový prst), houslový klíč a stuha. (*Krishna, 2002*)

Proteiny váží zinek jako kofaktor pro katalýzu nebo jako strukturální stabilizátor. V zinkových prstech je jeho role pouze strukturální a Zn^{2+} se nepodílejí na jejich funkci. (*Babu, a kol., 2006*) Navzdory své malé velikosti jsou ZF funkčně velmi rozmanité. Zapojují se do nukleových kyselin (DNA, RNA), interakcí protein-protein, váží malé ligandy (lipidy), a někdy také disponují enzymatickými vlastnostmi. (*Matthews, a kol., 2000*) Na DNA se nejčastěji váže struktura C2H2 (Obrázek č. 5), houslový klíč a Zn_2/Cys_6 . Na RNA se váží struktury kolena,

houslový klíč a struktura stuhu. Na interakcích protein-protein se podílí většina struktur. (Krishna, 2002), (Sztalmachova, 2011)



Obrázek č. 5: Struktura klasického zinkového prstu- C₂H₂ a jeho vazba na DNA. Převzato z (Rosypal, 2006): Cysteinové a histidinové zbytky jsou koordinovány k zinku.

Seznam zkratek

AMK	aminokyseliny
MT	metallothionein
ER	endoplazmatické retikulum
GIT	gastrointestinální trakt
MMP	matrixové metaloproteinázy
Arg	arginin
Cys	cystein
Gly	glycin
Pro	prolin
Asp	asparagin
His	histidin
Glu	glutamin
MTS	metallothioneiny
SH	thiolová skupina
GSH	redukovaný glutathion
GSSG	oxidovaný glutathion
ZF	zinkové prsty

Literatura

- Opinion of the Scientific Committee for Animal Nutrition on the use of zinc in feedingstuffs, 2003.
- BABU, M. M.; IYER, L. M.; BALAJI, S.; ARAVIND, L. The natural history of the WRKY-GCM1 zinc fingers and the relationship between transcription factors and transposons. *Nucleic Acids Research*, 2006, roč. 34. č. 22, s. 6505-6520. ISSN 0305-1048.
- BENCKO, V., CIKRT, M., LENER, J. Toxické kovy v životním a pracovním prostředí člověka: Grada Publishing, spol. s r. o., 1995.
- BITTEL, D. C.; SMIRNOVA, I. V.; ANDREWS, G. K. Functional heterogeneity in the zinc fingers of metalloregulatory protein metal response element-binding transcription factor-1. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, roč. 275. č. 47, s. 37194-37201. ISSN 0021-9258.
- CAHILL-MORASCO, R.; DEPASQUALE, M. A. Zinc toxicosis in small animals. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, 2002, roč. 24. č. 9, s. 712-+. ISSN 0193-1903.
- CUMMINGS, J. E.; KOVACIC, J. P. The ubiquitous role of zinc in health and disease. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 2009, roč. 19. č. 3, s. 215-240. ISSN 1479-3261.
- DASTYCH, M. Zinek- esenciální stopový prvek: FN Brno.
- EGEBLAD, M.; WERB, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature Reviews Cancer*, 2002, roč. 2. č. 3, s. 161-174. ISSN 1474-175X.
- FABRIK, I., KUKAČKA, J., PRŮŠA, R., ECKSCHLAGER, T., ADAM, V., KIZEK, R. Metallothionein a jeho klinický význam.
- FU, F.; SANDER, J. D.; MAEDER, M.; THIBODEAU-BEGANNY, S.; JOUNG, J. K.; DOBBS, D.; MILLER, L.; VOYTAS, D. F. Zinc Finger Database (ZiFDB): a repository for information on C2H2 zinc fingers and engineered zinc-finger arrays. *Nucleic Acids Research*, 2009, roč. 37. č., s. D279-D283. ISSN 0305-1048.
- GARCIA, J. S.; DE MAGALHAES, C. S.; ARRUDA, M. A. Z. Trends in metal-binding and metalloprotein analysis. *Talanta*, 2006, roč. 69. č. 1, s. 1-15. ISSN 0039-9140.
- GIESECKE, A. V.; FANG, R.; JOUNG, J. K. Synthetic protein-protein interaction domains created by shuffling Cys(2)His(2) zinc-fingers. *Molecular Systems Biology*, 2006, roč. 2. č., s. 15. ISSN 1744-4292.
- GUMULEC, J., MASAŘÍK, M., KŘÍŽKOVÁ, S., BABULA, P., HRABEC, R., ROVNÝ, A., MASAŘÍKOVÁ, M., KIZEK, R. Zinek, jeho transport a metabolismus u karcinomu prostaty- vliv metalotioneinu
- HESS, S. Y.; LONNERDAL, B.; HOTZ, C.; RIVERA, J. A.; BROWN, K. H. Recent advances in knowledge of zinc nutrition and human health. *Food and Nutrition Bulletin*, 2009, roč. 30. č. 1, s. S5-S11. ISSN 0379-5721.

[HTTP://ODS.OD.NIH.GOV/](http://ods.od.nih.gov/).

- KLUG, A. The discovery of zinc fingers and their development for practical applications in gene regulation. *Proceedings of the Japan Academy Series B-Physical and Biological Sciences*, 2005, roč. 81. č. 4, s. 87-102. ISSN 0386-2208.
- KREZEL, A.; MARET, W. Dual nanomolar and picomolar Zn(II) binding properties of metallothionein. *Journal of the American Chemical Society*, 2007, roč. 129. č. 35, s. 10911-10921. ISSN 0002-7863.
- KRISHNA, S. S., MAJUMDAR, I., GRISHIN, N. V. Structural classification of zinc fingers. Department of biochemistry. Texas: University of Texas, 2002.
- KRIZKOVA, S.; FABRIK, I.; ADAM, V.; HRABETA, P.; ECKSCHLAGER, T.; KIZEK, R. Metallothionein - a promising tool for cancer diagnostics. *Bratislava Medical Journal- Bratislavske Lekarske Listy*, 2009, roč. 110. č. 2, s. 93-97. ISSN 0006-9248.
- LANSDOWN, A. B. G.; MIRASTSCHIJSKI, U.; STUBBS, N.; SCANLON, E.; AGREN, M. S. Zinc in wound healing: Theoretical, experimental, and clinical aspects. *Wound Repair and Regeneration*, 2007, roč. 15. č. 1, s. 2-16. ISSN 1067-1927.
- MATTHEWS, J. M.; KOWALSKI, K.; LIEW, C. K.; SHARPE, B. K.; FOX, A. H.; CROSSLEY, M.; MACKAY, J. P. A class of zinc fingers involved in protein-protein interactions - Biophysical characterization of CCHC fingers from Fog and U-shaped. *European Journal of Biochemistry*, 2000, roč. 267. č. 4, s. 1030-1038. ISSN 0014-2956.
- MOCHEGANI, E.; MALAVOLTA, M. Zinc-gene interaction related to inflammatory/immune response in ageing. *Genes and Nutrition*, 2008, roč. 3. č. 2, s. 61-75. ISSN 1555-8932.
- OLAFSON, R. W. ELECTROCHEMICAL CHARACTERIZATION OF METALLOTHIONEIN METAL MERCAPTIDE COMPLEXES - APPLICATION OF CYCLIC VOLTAMMETRY TO INVESTIGATION OF METALLOPROTEINS. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 1988, roč. 19. č. 1, s. 111-125. ISSN 0302-4598.
- PECHOVÁ A., V. J. Zinek.
- PIOTROWSKI, J. K.; MOGILNICKA, E. M. METALLOTHIONEIN. *Postepy Biochemii*, 1976, roč. 22. č. 3, s. 401-419. ISSN 0032-5422.
- PRITCHARD, G. C.; LEWIS, G.; WELLS, G. A. H.; STOPFORTH, A. ZINC TOXICITY, COPPER DEFICIENCY AND ANEMIA IN SWILL-FED PIGS. *Veterinary Record*, 1985, roč. 117. č. 21, s. 545-548. ISSN 0042-4900.
- ROSYPAL, S. Úvod do molekulární biologie, 2006.
- STEFANIDOU, M.; MARAVELIAS, C.; DONA, A.; SPILIOPOULOU, C. Zinc: a multipurpose trace element. *Archives of Toxicology*, 2006, roč. 80. č. 1, s. 1-9. ISSN 0340-5761.
- STUDNICKOVA, M.; TURANEK, J.; ZABRSOVA, H.; KREJCI, M.; KYSEL, M. Rat liver metallothioneins are metal dithiolene clusters. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 1997, roč. 421. č. 1-2, s. 25-32. ISSN 0022-0728.
- SZTALMACHOVA, M. Kovy vázající proteiny v živočišných organismech Ústav chemie a biochemie. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2011.
- TAPIERO, H.; TEW, K. D. Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2003, roč. 57. č. 9, s. 399-411. ISSN 0753-3322.



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

- TUBEK, S. Selected zinc metabolism parameters in relation to insulin, renin-angiotensin-aldosterone system, and blood pressure in healthy subjects - Gender differences. *Biological Trace Element Research*, 2006, roč. 114. č. 1-3, s. 65-72. ISSN 0163-4984.
- UNDERWOOD, E., J. The mineral nutrition of Livestock, 1981.
- VACÍK, J., BARTHOVÁ, J., PACÁK, J., STRAUCH, B., SVOBODOVÁ, M., ZEMÁNEK, F. Přehled středoškolské chemie. Praha: SPN-pedagogické nakladatelství, a.s., 1999 (vol 2.).
- ZITKA, O.; KUKACKA, J.; KRIZKOVA, S.; HUSKA, D.; ADAM, V.; MASARIK, M.; PRUSA, R.; KIZEK, R. Matrix Metalloproteinases. *Current Medicinal Chemistry*, roč. 17. č. 31, s. 3751-3768. ISSN 0929-8673.



NanoBioMetalNet

CZ.1.07/2.4.00/31.0023

Tento projekt je spolufinancován z Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu České republiky.