



SBORNÍK Z WEBINÁŘE
11. 11. 2021
VÚVeL

**NOVÉ POZNATKY A METODY K PROKAZOVÁNÍ ZNEUŽÍVÁNÍ
ANABOLICKÝCH STEROIDŮ VE VÝKRMU HOSPODÁŘSKÝCH ZVÍŘAT,
CÍLENĚ PRASAT – VÚVEL ACADEMY VIII**

Webinář přináší poznatky vzniklé v souvislosti s řešením projektu NAZV QK1910311.



POZVÁNKA



Česká technologická platforma pro zemědělství ve spolupráci s Výzkumným ústavem živočišné výroby, v. v. i., Českou zemědělskou univerzitou Praha, Mendelovou univerzitou Brno a Výzkumným ústavem veterinárního lékařství, v. v. i. si Vás dovoluje pozvat na **webinář**

NOVÉ POZNATKY A METODY K PROKAZOVÁNÍ ZNEUŽÍVÁNÍ ANABOLICKÝCH STEROIDŮ VE VÝKRMU HOSPODÁŘSKÝCH ZVÍŘAT, CÍLENĚ PRASAT – VÚVEL ACADEMY VIII

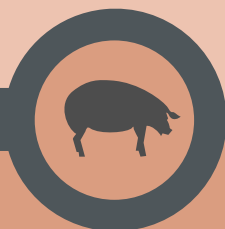
PROGRAM

- **Úvod do problematiky sledování zakázaných a nepovolených látek v potravinách v rámci EU** - MVDr. Veronika Vlasáková (SVS ČR) Praha
- **Současný stav monitoringu zakázaných látek v hospodářských chovech** - Mgr. Martina Rejtharová (ÚSKVBL Brno)
- **Principy působení androgenních anabolických steroidů v živých organismech** - MVDr. Jana Doležalová, Ph.D. (VETUNI Brno)
- **Histologické změny cílových tkání prasat po aplikaci anabolických steroidů** - prof. MVDr. Zbyšek Sládek, Ph.D. (MENDELU Brno)
- **Principy používání a aplikací anabolických steroidů** - Ing. Kamil Šťastný, Ph.D. (VÚVeL Brno)
- **Aktuální trendy ve vývoji analytických metod na bázi metabolomiky** - Mgr. Kristína Pútecová (VÚVeL Brno)
- **Aktuální trendy ve vývoji analytických metod na bázi proteomiky** - Mgr. Jan Gebauer, Ph.D. (VÚVeL Brno)

Kdy:
11. 11. 2021
13:00 – 15:00 hod.

Kde:
On-line z VÚVeL

Kontakt:
Tel.: 773 756 631



Registrace přes vf-registrace@vri.cz nebo přes stránky www.vri.cz. Poté obdržíte odkaz na on-line platformu.

Webinář přináší poznatky vzniklé v souvislosti s řešením projektu NAZV QK1910311.





Úvod do problematiky sledování zakázaných a nepovolených látek v potravinách v rámci EU

„Nové poznatky a metody k prokazování zneužívání anabolických steroidů ve výkrmu hospodářských zvířat, cíleně prasat“

Vlasáková Veronika, VÚVeL, 11.11.2021



Zakázané látky - úvod

- ❖ panika z hormonů v potravinách stále živá
- ❖ vyvracení mýtů



Zakázané látky - úvod

- ❖ již od roku 1981 platila směrnice (81/602/EEC), která zakazovala používání látek s hormonálním účinkem pro podporu růstu hospodářských zvířat

např. 17- β -estradiol, včetně jeho esterických derivátů, testosteron, progesteron, zeranol, trenbolon acetát a melengestrolacetát

V současnosti **směrnice 96/22/ES** (vyhláška 291/2003)

- zákaz použití hormonálních látek pro podporu růstu u hospodářských zvířat
- zcela zakázáno jakékoliv použití 17- β -estradiolu
- beta-sympatomimetika - pouze ke zmírnění kontrakcí dělohy u krav při porodu a u koňovitých

Zakázané látky - úvod

- ❖ zákaz se vztahuje na členské státy Evropské unie a také na dovoz zvířat a potravin živočišného původu ze třetích zemí
- ❖ nepovolená nebo zakázaná veterinární léčiva jsou obzvláště kontrolovanou skupinou látek včetně kontroly jejich přísně vymezeného použití
- ❖ Česká republika a ostatní členské státy EU respektují úplný zákaz používání látek s hormonálním nebo tyreostatickým účinkem a beta-agonistů pro stimulaci užitkovosti

Zakázané látky - úvod

Zákon o veterinární péči (č. 166/2009 Sb.)

- doplňkové látky a léčivé přípravky, které mají hormonální, tyreostatický nebo beta-adrenergní účinek nesmí být volně uváděny do oběhu a podávány zvířatům, jejichž produkty jsou určeny k výživě lidí
- chovatel může uvádět na trh pouze zvířata, kterým nebyly podávány nepovolené nebo zakázané látky nebo přípravky

Zakázané látky - úvod

- ❖ V případě potravinových zvířat mohou být použita pouze taková léčiva, která obsahují farmakologicky aktivní látky, u kterých proběhlo kladné toxikologické hodnocení za účelem stanovení jejich maximálního limitu reziduí (MLR) a jsou uvedeny v seznamu povolených látek.
- ❖ zneužití hormonálních látek k účelům zvyšování užitkovosti hospodářských zvířat je v České republice rovněž trestným činem (trestní zákoník)

Plán pravidelného sledování (monitorování) reziduí a látek kontaminujících v potravinovém řetězci”

- ✓ každoročně vydává Ústřední veterinární správa
- ✓ rezidua látek s anabolickým účinkem a nepovolených látek, veterinárních léčivých přípravků, látek kontaminujících životní prostředí, pesticidů a jiných látek uvedených v příloze č. 1 k vyhlášce 291/2003
- ✓ vzorky od živých i poražených zvířat, krmiva a voda
- ✓ nevyhovující zjištění - opatření, jejichž cílem je zabránit ohrožení spotřebitele a životního prostředí

- ✓ ojediněle zjišťovány zvýšené hladiny přirozených hormonů – další šetření a analýzy dokazují přirozený původ, např. důsledek působení pohlavních hormonů u kryptorchidních prasat nebo při neodhalené březosti před porážkou u skotu, stresu u zvířat při porážení nebo při odběru vzorků u živých zvířat
- ✓ prozatím nebylo použití zakázaných hormonálních látek v České republice nikdy prokázáno – viz zprávy na webu ÚVS SVS „Kontaminace potravinového řetězce cizorodými látkami”
<https://www.svscr.cz/category/dokumenty-a-publikace/prehled-podle-temat/kontaminace-potravnich-retezcu/>
- ✓ osvěta a informovanost mezi chovateli (publikace, semináře), vysoká úroveň a organizace veterinárního dozoru a jiné faktory

Děkuji vám za pozornost.

Současný stav monitoringu zakázaných látek v hospodářských chovech

🇨🇪 VÚVeL, 11. listopadu 2021

🇨🇪 Mgr. Martina Rejtharová rejtharova@uskvbl.cz

🇨🇪 Ústav pro státní kontrolu veterinárních
biopreparátů a léčiv

Brno - Medlánky, Hudcova 56a



Zakázané látky pro potravinová zvířata

🇨🇪 **Hormonálně účinné látky - Směrnice Rady 96/22/ES** o zákazu používání některých látek s hormonálním nebo tyreostatickým účinkem a beta-sympatomimetik v chovech zvířat

🇨🇪 **Zakázaná léčiva - Tabulka 2 Přílohy Nařízení Komise (EU) č. 37/2010 = látky zakázané pro zvířata určená k produkci potravin**



Analýzy reziduí zakázaných látek

🇨🇪 **Pro zakázané látky neexistuje žádná bezpečná koncentrace reziduí v potravinách.**

🇨🇪 Každý potvrzený nález znamená nevyhovující vzorek.

🇨🇪 **Výsledky úředního monitoringu reziduí musí být jednoznačné nade vší pochybnost.**

🇨🇪 **vyhovující = riziko konzumenta**

🇨🇪 **nevyhovující = riziko producenta**



Požadavky na laboratoře provádějící vyšetřování úředních vzorků

☑ Nařízení EP a Rady (EU) 2017/625 o úředních kontrolách

- ☑ [Akreditace](#) dle EN/ISO 17 025 (Požadavky na zkušební laboratoře)
- ☑ Písemné [určení](#) laboratoře k provádění zkoušek.
- ☑ Účast ve [zkoušení způsobilosti](#) organizovaném příslušnými Evropskými referenčními laboratořemi.

☑ **Rozhodnutí Komise 2002/657/ES** (Požadavky na metody)

- ☑ [Interpretace](#) výsledků
- ☑ Stanovené analytické [techniky](#) pro konkrétní látky
- ☑ Požadavky na [validace](#) metod



Požadavky na laboratoře provádějící vyšetřování úředních vzorků

☑ **Screeningové metody**

- ☑ rychlé testy, výsledky nesmí být falešně negativní
- ☑ **vyhovující nebo podezřelé výsledky**

☑ **Konfirmační metody**

- ☑ analytické metody poskytující jednoznačný výsledek
- ☑ **vyhovující nebo nevyhovující výsledky**



Požadavky na analytické metody pro úřední stanovení reziduí

Výsledky stanovení reziduí musí být **jednoznačné**:

☑ **Vyhovující výsledky:** ([ochrana konzumenta](#))

- ☑ s maximální možnou spolehlivostí **vyločit** přítomnost nepovolené látky nebo nadlimitní koncentrace povolené látky

☑ **Nevyhovující výsledky:** ([ochrana producenta](#))

- ☑ s maximální možnou spolehlivostí **potvrdit** přítomnost nepovolené látky nebo nadlimitní koncentrace povolené látky



Požadavky na analytické metody pro úřední stanovení reziduí

Nevyhovující výsledky musí být nad veškerou pochybnost potvrzeny **konfirmační metodou**.

Např. pro zakázané látky musí být použita vhodná separační technika (plynová chromatografie - GC nebo kapalinová chromatografie - LC) spojená s hmotnostně selektivním detektorem (hmotnostní spektrometrie - MS).



Požadavky na analytické metody pro úřední stanovení reziduí

Používaná analytická metoda musí být **validovaná** (*prokázání vhodnosti použití pro daný účel*) pro každou kombinaci **analyt / matrice**.

Validační parametry:

- ✓ linearita, rozsah použitelnosti
- ✓ přesnost, správnost, nejistota měření
- ✓ robustnost, stabilita (v matrici)
- ✓ **citlivost – klíčový parametr pro zakázané látky**

Interpretace výsledků

dle Rozhodnutí Komise 2002/657/ES

✓ Limit rozhodnutí $CC\alpha$ pro konfirmační metody

Je-li ve vzorku potvrzena přítomnost látky v koncentraci vyšší než $CC\alpha$, je tento vzorek nevyhovující.

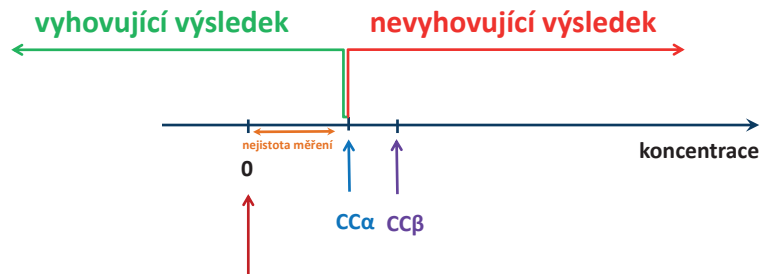
✓ Detekční schopnost $CC\beta$ pro screeningové metody

$CC\beta$ je nejnižší koncentrací látky, kterou je metoda schopna detekovat ve vzorku se spolehlivostí 95%.

Interpretace výsledků – **zakázané látky**

dle Rozhodnutí Komise 2002/657/ES

- ✔ **Limit rozhodnutí CC α** pro konfirmační metody
- ✔ **Detekční schopnost CC β** pro screeningové metody



Interpretace výsledků

dle Rozhodnutí Komise 2002/657/ES

- ✔ **CC α i CC β jsou parametry získané při validaci metody v konkrétní laboratoři - pro různé laboratoře se liší.**
- ✔ **Požadavky na citlivost metod pro zakázané látky – minimální koncentrace.**
- ✔ **CC β používaných metod musí být nižší než MMPR Minimum method performance requirements.**



Přehled analyzovaných skupin **zakázaných látek**

- ✔ **Hormonálně účinné látky (stimulátory růstu)**
 - ✔ **steroidy (androgeny, estrogeny, gestageny, kortikoidy, přirozené hormony)**
 - ✔ **stilbeny, thyreostatika**
 - ✔ **beta-agonisté**
- ✔ **Zakázaná léčiva**
 - ✔ **chloramfenikol**
 - ✔ **nitrofurany**
 - ✔ **nitroimidazoly**



Budoucnost monitoringu reziduí

- ✓ Na úrovni Evropské Komise probíhá diskuse s členskými státy o změnách v provádění úředního monitoringu reziduí. Upravená legislativa by měla platit od roku 2022.
- ✓ **Trvá důraz na zakázané hormonálně účinné látky,** je třeba se věnovat analytickému odlišení přirozených (endogenních) a syntetických (ilegálně podaných) hormonů.
- ✓ Nové skupiny látek ke sledování
(např. polypeptidické hormony – somatotropin)
- ✓ Nové potraviny – hmyz, plazi

Nevyhovující nálezy

- ✓ Vždy následuje úřední šetření zdroje kontaminace a odběr následných vzorků.
- ✓ **Je zabráněno uvedení nebezpečné potraviny na trh.**
- ✓ V případě pochybení jsou uděleny pokuty, produkce se likviduje na náklady producenta.
- ✓ **Rozhodnutí úřední autority o bezpečnosti musí být v každém případě opřené o analýzu rizika.**



Děkuji za pozornost.



Principy působení androgenních anabolických steroidů v živých organismech

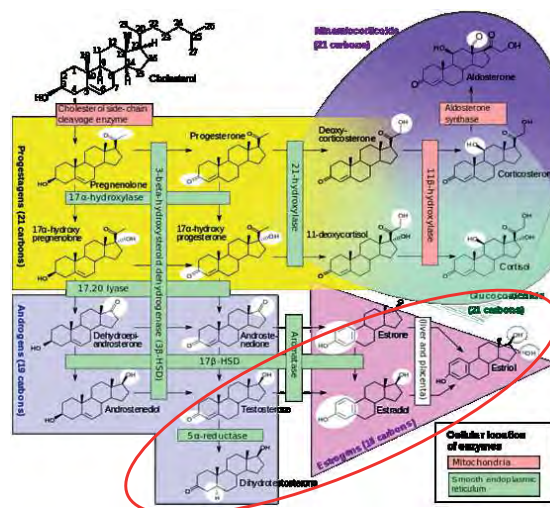
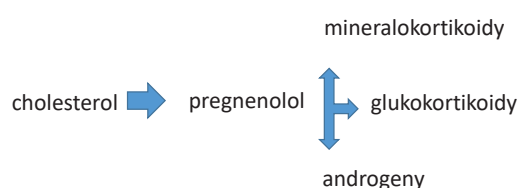
MVDr. Jana Doležalová, Ph.D.

Ústav fyziologie a Klinická laboratoř pro malá zvířata

Veterinární univerzita Brno

Anabolické steroidy

- produkovány z cholesterolu, primárně odvozeného z lipoproteinů
- Syntéza: různé tkáně, nejvýrazněji nadledvinami a gonádami (vaječníky a varlaty)



Steroidogeneze dle Häggström and Richfield (2014)

Anabolické steroidy

- imitace působení testosteronu
 - androgenní efekt – zvyšuje sekundární samčí pohlavní znaky
- anabolický efekt zvyšuje syntézu proteinů, zejména ve svalech

Anabolické steroidy u zvířat

- používané endogenní steroidy (estradiol, progesteron, testosteron)
- pohlaví a vyspělost zvířete ovlivňují rychlost jeho růstu a složení těla
 - býci rostou o 8–12% rychleji než volí
 - (nárůst dle přípravku 8-15% hmotnosti/100-120 dní)
- testosteron - vazba na receptory ve svalu, stimulace začlenění aminokyselin do bílkovin → zvýšení svalové hmoty bez současného zvýšení tukové tkáně
- estradiol → stimulace somatotropní osy → zvýšení růstového hormonu IGF → produkce a dostupnosti IGF-1 modulací proteinů vázajících IGF
 - → zvyšuje retenci dusíku, rychlost růstu 10-20% u volů, zvyšuje konverzi krmiva o 5-8%
 - Anabolický účinek u jalovic a telat (ne u prasat)
- mohou přechodně ovlivnit chování zvířat
- Progesteron ? anabolický efekt, zpomaluje uvolňování estradiolu z implantátů

Exogenní - syntetické steroidy

- syntetický progestagen
 - neúčinný u březích nebo kastrovaných jalovic nebo u volů
 - potlačuje opakující se říje a zvyšuje rychlost růstu a účinnost krmiva
 - potlačuje ovulaci → snížením luteinizačního hormonu (LH), ale tvoří se však velké folikuly → zvýšení estradiolu → růst

Exogenní - syntetické nesteroidní estrogeny

- zvyšují zejména retenci dusíku, pro stavbu aminokyselin
- zvyšují rychlost růstu o 12%–15% a konverzi krmiva o 6–10%
- u jalovic jsou však pozorovány nižší reakce, podporují účinky androgenů

Nadměrný příjem

- KVS, játra, nadledviny, ledviny, gonády
 - snížení lipoproteinů s vysokou denzitou
 - zvýšení lipoproteinů s nízkou denzitou
 - zvýšení apo-lipoproteinů podporujícího aterosklerozu A
 - hepatotoxické - biliární stágnace, peliosis hepatis, hepatomy (reverzibilní)
 - potlačení osy hypotalamus- nadledviny (reverzibilní)
 - ledviny - akutní selhání ledvin, Wilmsův nádor
 - srdeční hypertrofie
 - spolu s nepříznivými účinky na reprodukci, včetně azoospermie, anestrů, atrofie varlat a hypertrofie klitorisu
 - hypogonadismus po vysazení exogenních androgenů
 - neuropsychiatrické změny (Ho)

Vliv steroidních hormonů na mikroskopickou strukturu kosterní svaloviny a varlat prasat

SKOUPÁ K., BÁTIK A., TÁFLOVÁ M., SLÁDEK Z.
Ústav morfologie, fyziologie a genetiky zvířat
Mendelova univerzita v Brně



V EU platí úplný
zákaz používání
anabolik při
výkrmu zvířat



Neexistují téměř
žádné studie
referující efekt
anabolik na
strukturu tkání



Steroidy vyvolávají
ve tkáních
pozorovatelné
změny v
mikrostruktuře

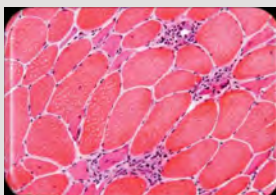
← Cílem je popsat mikrostrukturu tkání po vystavení anabolikům →



- 3 skupiny pokusných prasat
- aplikace testosteronu a nandrolonu
- kastrovaná i nekastrovaná zvířata

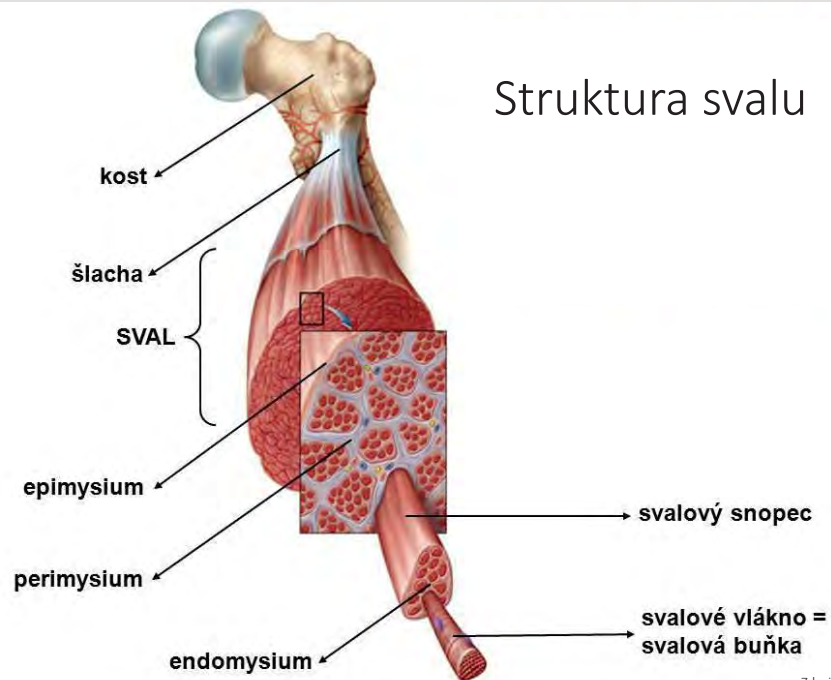


- odběr tkáně z kotlety
- odběr tkáně z varlat



- histologické zpracování
- barvení H&E
- pozorování v mikroskopu

Struktura svalu



Zdroj: <https://slideplayer.cz/slide/3138703/>

Parametry měření svaloviny

Průměr a plocha svalových vláken

Počet svalových vláken na jednotku plochy

Množství endomysia mezi svalovými vlákny

Počet jader ve svalových vláknech

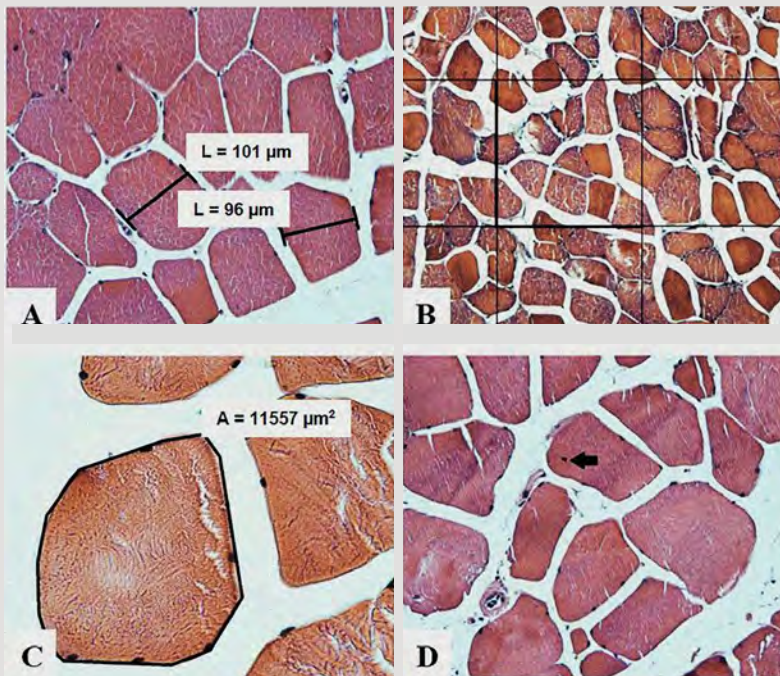
Parametry měření varlat

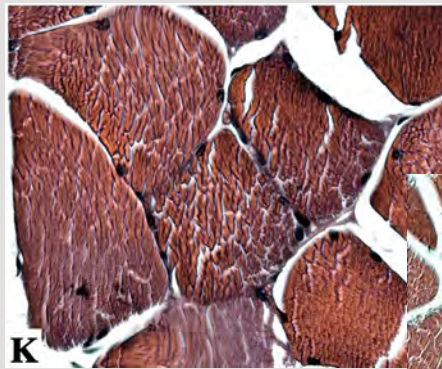
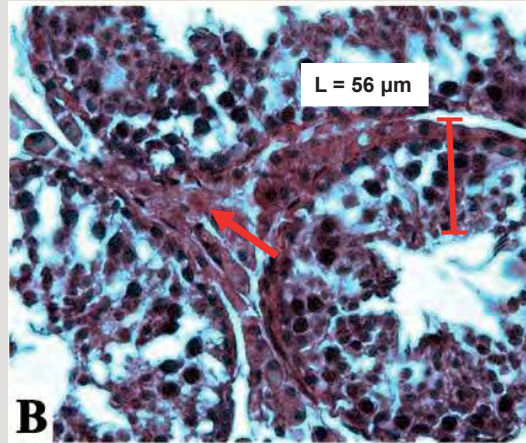
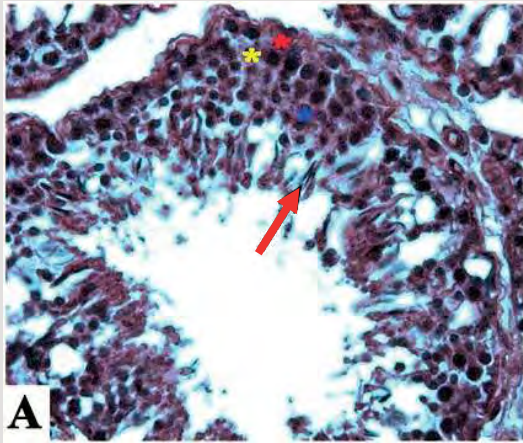
Průměr a tvar semenotvorného kanálku

Vzdálenost semenotvorných kanálků od sebe

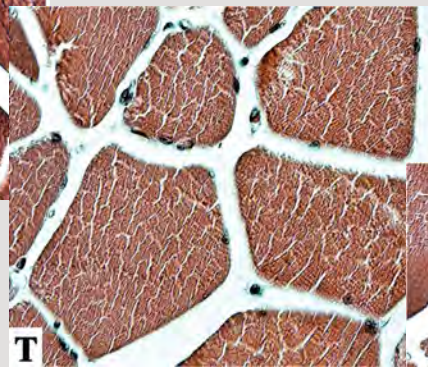
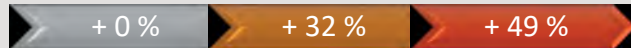
Výška zárodečného epitelu

Výskyt Leydigových buněk

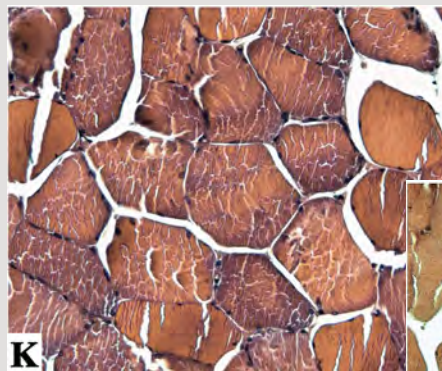




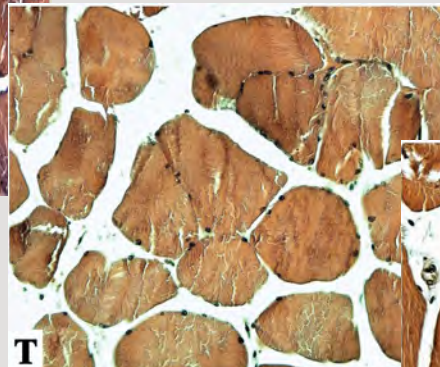
Průměr svalových vláken

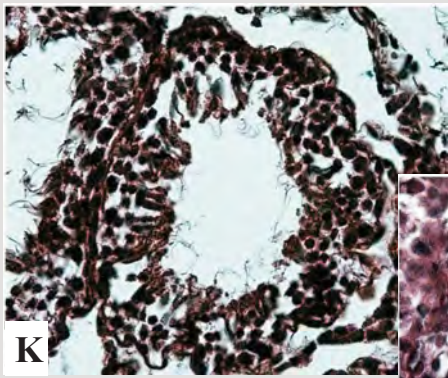


Plocha svalových vláken

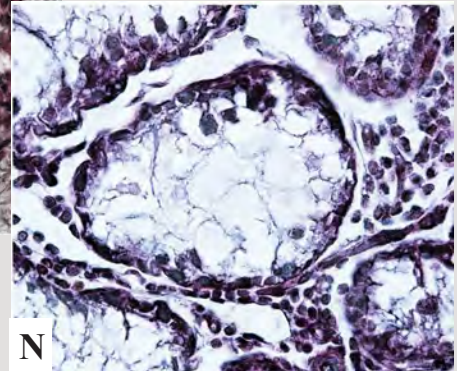
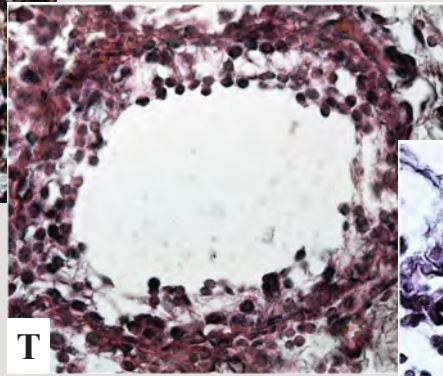


Množství endomysia (vaziva) mezi svalovými vlákny

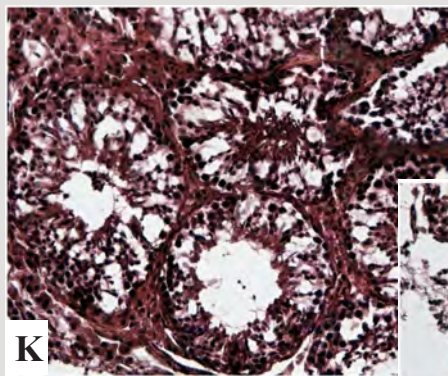




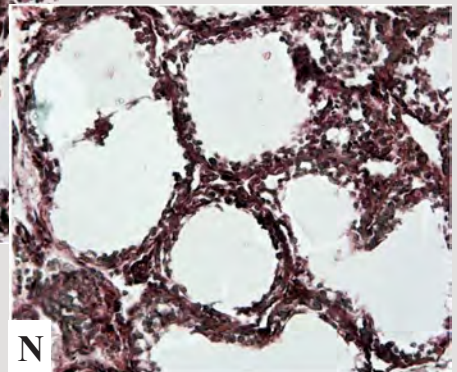
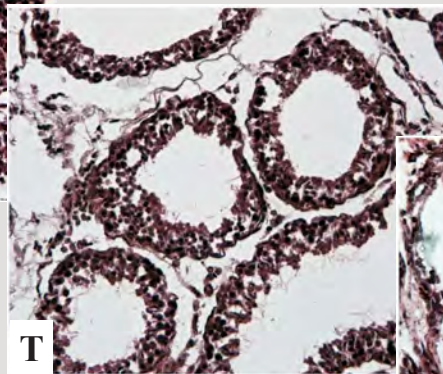
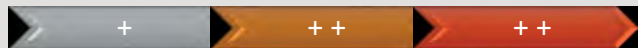
Výška zárodečného epitelu



Přítomnost spermatid



Vzdálenost kanálků



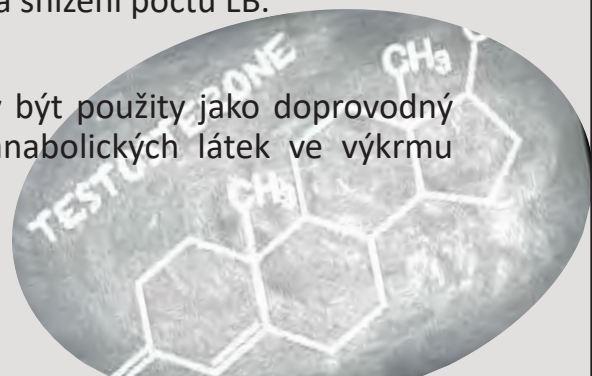
Výskyt Leydigových buněk



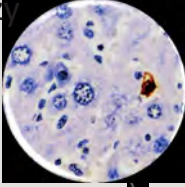
Závěr

Aplikace testosteronu a nandrolonu způsobila signifikantní změny v mikrostruktuře svalové tkáně a varlat. Dochází k hypertrofii svalových vláken, ve varlatech k úbytku zárodečného epitelu, zastavení procesu spermatogeneze a snížení počtu LB.

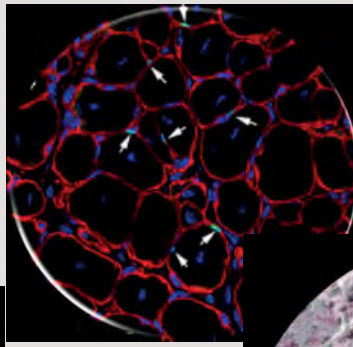
Je zřejmé, že tyto změny by mohly být použity jako doprovodný parametr při odhalování použití anabolických látek ve výkrmu prasat.



Sledování
apoptózy

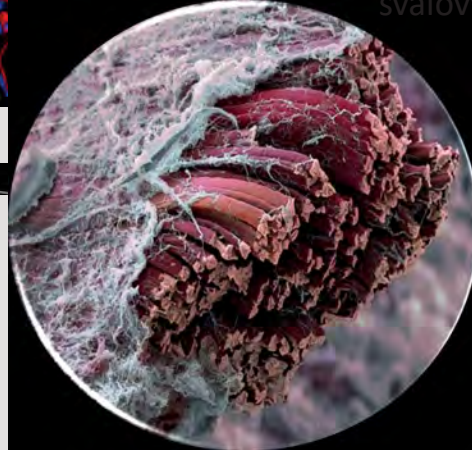


Další
plánované
analýzy



Značení satelitních buněk

Ultrastruktura
svalových vláken



Elektronová mikroskopie

Děkuji za Vaši pozornost

Principy používání a aplikace anabolických steroidů

Aktuální poznatky a nové metody k prokazování zneužívání anabolických steroidů ve výkrmu hospodářských zvířat



Oddělení infekčních chorob a preventivní medicíny

Kamil Šťastný

Brno
listopad 2021

Chemická analýza anabolických steroidů



Zákaz používání hormonálních preparátů a jiných stimulátorů růstu v potravinářské výrobě ve státech Evropské unie

Schopnost prosazování zákazu, vyžaduje mít k dispozici především účinné analytické nástroje pro kontrolu a případné prokazování nelegálního použití.

Současné používané analytické techniky v referenčních laboratořích:

- obvykle spoléhají na monitorování omezeného počtu reziduí předem známých zakázaných látek ve vybraných maticích (různé tkáně, moč, sérum...)
- dominantní analytickou technikou je kapalinová/plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS)

Proč hledat a vyvíjet nové metody k prokazování zneužívání anabolických steroidů ???

Klasifikace anabolické steroidy podle schopnosti je detekovat a prokazovat jejich zneužívání současnými analytickými metodami LC-MS/MS (GC-MS/MS):

- **„Endogenní“ steroidy** - jsou to dobře známé steroidy, které jsou uváděny na trh jako syntetické preparáty, ale jejich chemické struktury jsou identické endogenním steroidům, které mohou přirozeně existovat, např. **testosteron**, **19nor-testosteron (nandrolon)**
- **„Exogenní“ steroidy** – jedná se o „klasické“ steroidy, které jsou dobře známé na trhu, jako je například **stanozolol**, **boldenon**, tyto steroidy obsahují syntetické chemické struktury, které jsou dobře známé ale přirozeně se v organismech nevyskytují,
- **„Designer“ steroidy** (nově syntetizované) – dříve v literatuře uváděné jako unmarketed steroidy, které obsahují syntetické struktury, u kterých se předpokládá, že se mohou a nemusí přirozeně vyskytovat, ale jejich chemické struktury nejsou známé.

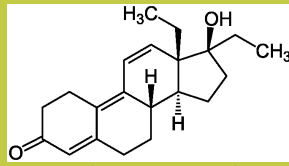
Příklad: sportovní doping

Do povědomí široké veřejnosti se tyto nově syntetizované steroidy dostaly v roce 2003 v souvislosti s dopingovou aférou americké sprinterky Marion Jones a užitím THG ("The Clear,,).

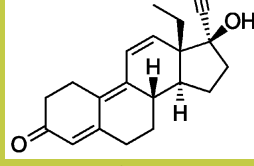
tetrahydrogestrinon (THG)

vs.

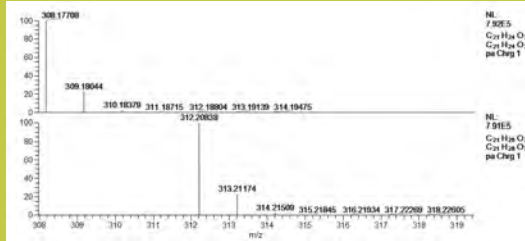
gestrinon (Gestrin)



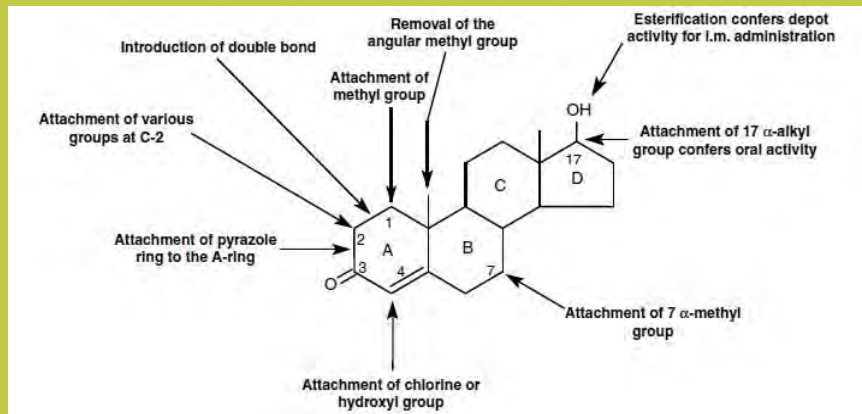
$C_{21}H_{28}O_2$ $m/z = 312,20838$ g/mol



$C_{21}H_{24}O_2$ $m/z = 308,17708$ g/mol



Syntetické možnosti steroidního skeletu



<https://www.steroids.com/catalogue-download>



Proč hledat a vyvíjet nové metody k prokazování zneužívání anabolických steroidů ???

Druhý, dnes velmi široce diskutovaný problém možného účinného bránění detekce použití anabolických steroidů **souvisí s aplikací anabolických steroidů a jejich snadnou dosažitelností:**

- „**koktejly**“ – aplikace ve formě kombinací dvou a více steroidů, koktejly se synergickým biologickým efektem, ale s použitou nízkou koncentrací jednotlivých steroidů.
- **Ceny (+ snadná dostupnost)**, za které se tyto preparáty dnes prodávají na černém trhu, jsou významně nižší, mnohdy řádově, než tomu bylo ještě v 90. letech.

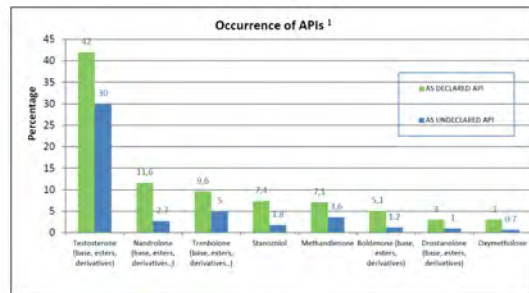
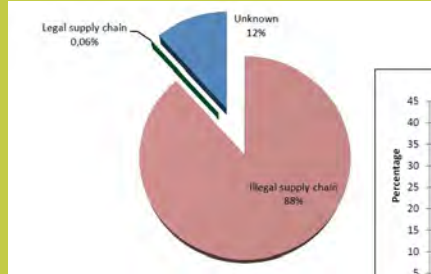
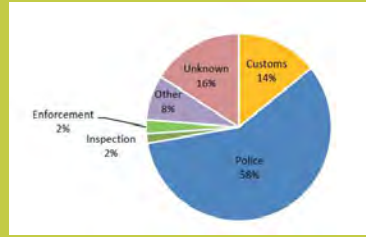


Snadná dostupnost AAS...???

V zemích EU:

Official Medicines Control Laboratories (OMCLs): Market Surveillance of Suspected Illegal Products, MSSIP003: Illegal Anabolic Steroids - Summary Report 2018

- 1600 vzorků z 16 Evropských zemí:



Snadná dostupnost AAS...???

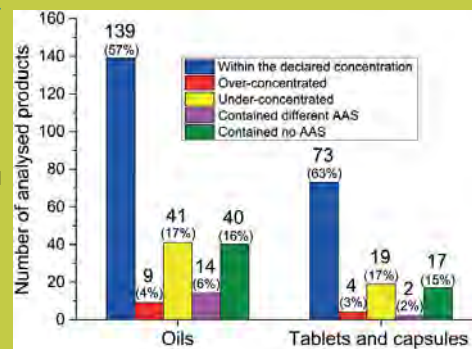
V ČR a na Slovensku:

Development of an UHPLC-MS/MS method for the determination of anabolic steroids currently available on the black market in the Czech Republic and Slovakia

Tircova B., Kozlík P. a Bosáková Z.

Drug Testing and Analysis · November 2018

➤ Celkem bylo získáno **358 produktů AAS** od uživatelů v ČR a na Slovensku. Produkty AAS vyrábělo 48 různých výrobců, z nichž 19 bylo od farmaceutických společností a 29 jich s největší pravděpodobností vyrobili ilegální laboratoře. Produkty AAS byly získány dobrovolně, většinou od kulturistů a členů fitness center (z různých měst) v období od října 2017 do ledna 2018.



<https://www.researchgate.net/publication/328933064>



Proč hledat a vyvíjet nové metody...?



K řešení dokazování těchto nepovolených praktik s anaboličnými steroidy je naléhavě zapotřebí intenzivně hledat nové analytické metody, alternativní způsoby detekce s využitím moderních analytických technik.



**Metabolomika +
Proteomika + ...omiky**



**Zdravé a bezpečné potraviny =
spokojený zákazník**



Metabolomická analýza není v legislativě..?

Použití metabolomické analýza je dnes výhradně v rovině vědeckého bádání a není v legislativě.....

Např. první takový krok učinila v legislativě WADA v humánním dopingu :

“Sufficient proof of an anti-doping rule violation is established by either of the following: presence of a prohibited substance or its **metabolites or markers...**, It is each *Athlete's* personal duty to ensure that no *Prohibited Substance* enters his or her body. *Athletes* are responsible for any *Prohibited Substance* or its *Metabolites* or *Markers* found to be present in their *Samples*.”

[WADA code, article 2.1, 2.1.1 and 2.1.2, December 2009, 2021 WADCode]

Obdobně i v oblasti anti-dopingu u závodních koní byla změněna právní formulace:

“A finding of a prohibited substance means a finding of the substance itself, a metabolite of the substance, an isomer of the substance, an isomer of a metabolite, or a pro-drug of the substance. The finding of **any scientific indicator** of administration or other exposure to a prohibited substance is also equivalent to the finding of the substance.

[International Agreement on Breeding, Racing and Wagering, article 6, April 2009 (25 January 2019), International Federation of Horseracing Authorities, www.ifhaonline.org].



Děkuji Vám za pozornost..
stastny@vri.cz



Aktuální trendy ve vývoji analytických metod na bázi metabolomiky

Kristína Tošnerová
Oddělení infekčních chorob a preventivní medicíny

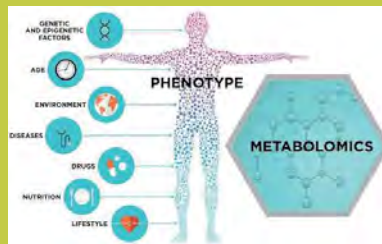
Brno
2021



Základní pojmy metabolomiky

Metabolomika byla prvně obecně definována **Oliverem Fiehnem** v roce **2002**.

První vědecký časopis specializující se na metabolomiku **Metabolomics** (Springer) byl vydán v roce **2005**.



Dynamický rozvoj metabolomiky v posledních letech vedl ke vzniku **víceroch analytických strategií**



Rychlá a kompletní analýza vzorku bez nutné identifikace a kvantifikace jednotlivých metabolitů

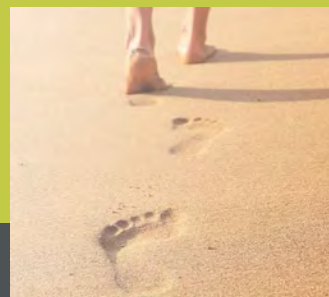
Fingerprinting

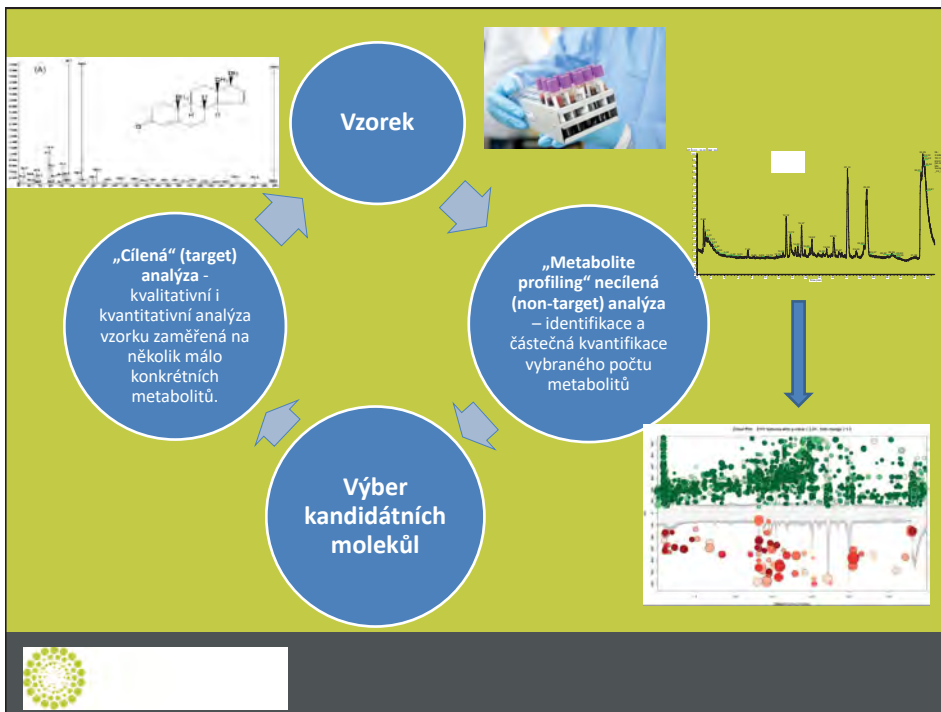
„otisk prstu“ je výsledkem analýzy informace o intracelulárních metabolitech - **endometabolom**



Footprinting

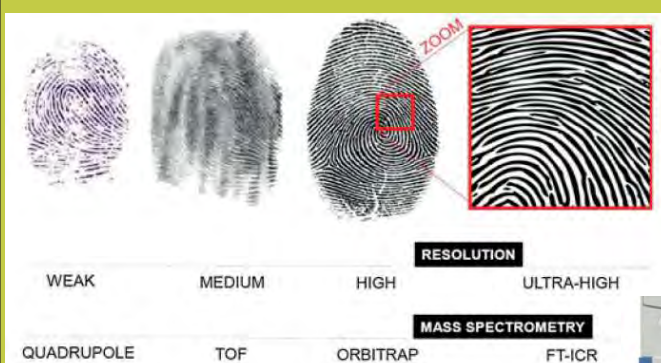
„otisk nohy“ je výsledkem analýzy informace o extracelulárních metabolitech - **exometabolom**.



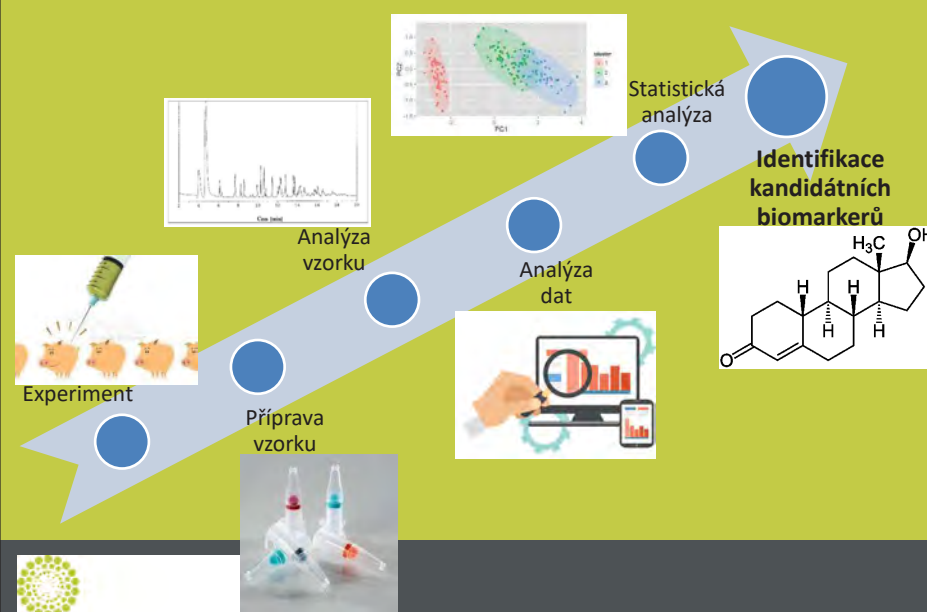


Hlavní nástroje metabolomiky (HR-MS)

Porovnání hmotnostních spektrometrů

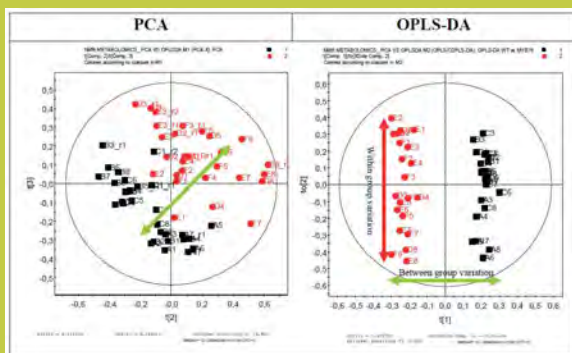


Postup metabolomického experimentu



Výsledky metabolického experimentu

Naměřené datové soubory jsou statisticky analyzovány pomocí vícerozměrné statistické analýzy. Nejčastěji se využívají metody PCA a OPLS-DA. Mohou být použity i další metody, např.: Shluková analýza, Faktorová analýza, SVM...



Výsledky statistického zpracování dat v metabolické analýze

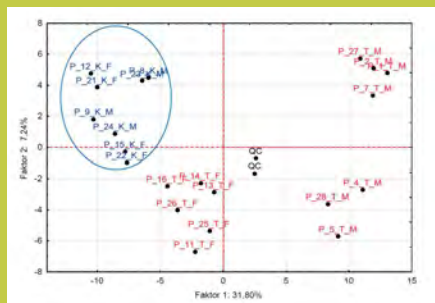


Výsledky našeho experimentu s testosteronem a nandrolonem na prasatech

Statistické metody založené na schopnosti diferencovat

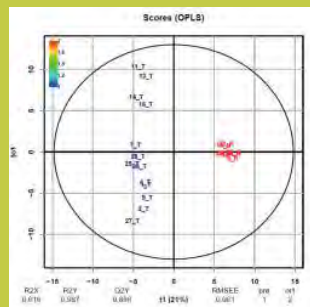
PCA

(Principal Component Analysis)



OPSL

(Orthogonal Partial Last Squares)



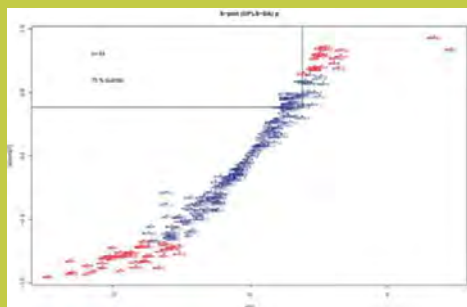
Výsledky statistického zpracování dat v metabolické analýze



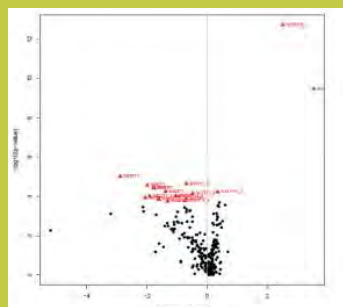
Výsledky našeho experimentu s testosteronem a nandrolonem na prasatech

Statistické metody založené na odhalení vhodných biomarkrů

S-plot



Vulkano-plot

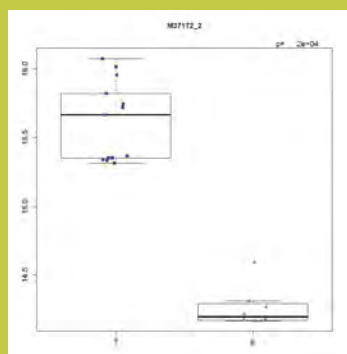
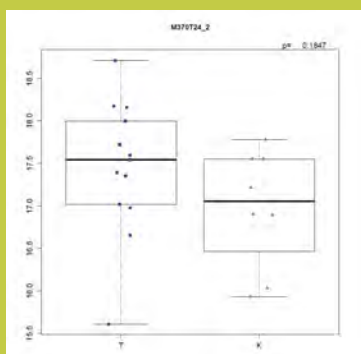


Výsledky statistického zpracování dat v metabolické analýze



Statistické metody založené na porovnání jednotlivých metabolitů

Box-plot



Stastny, K.; Puteцова, K.; Leva, L.; Franek, M.; Dvorak, P.; Faldyna, M. **Profiling of Metabolomic Changes in Plasma and Urine of Pigs Caused by Illegal Administration of Testosterone Esters.** *Metabolites* 2020, 10, 307. <https://doi.org/10.3390/metabo10080307>



Děkuji Vám za pozornost.....





Aktuální trendy ve vývoji analytických metod na bázi proteomiky

Jan Gebauer



- VUVeL Brno -
- 11. listopad 2021 -

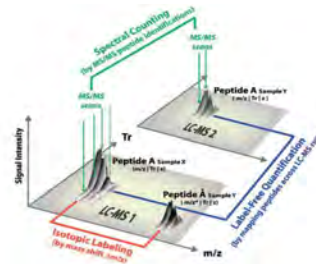
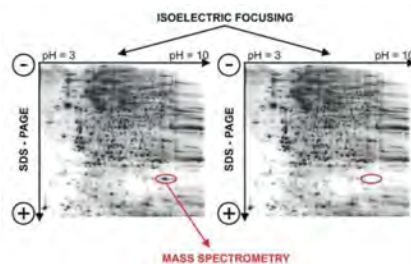
● Proteomika

= analýza proteomu buňky/tkáně pomocí hmotnostní spektrometrie



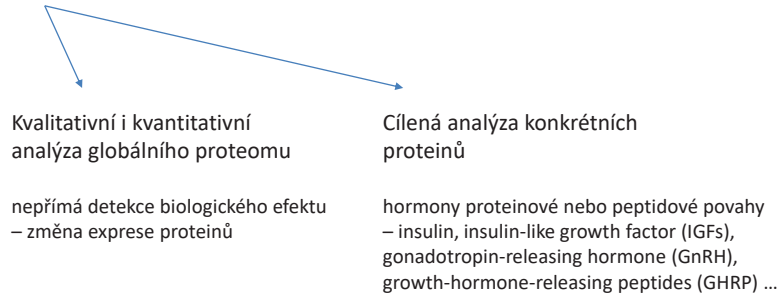
● Proteomika

= analýza proteomu buňky/tkáně pomocí hmotnostní spektrometrie



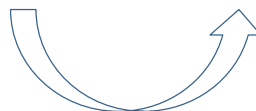
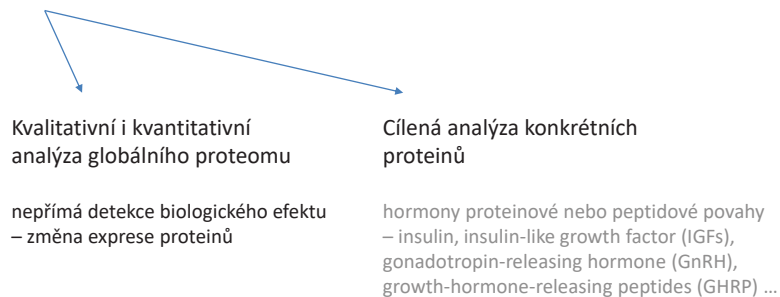
● Proteomika

= analýza proteomu buňky/tkáně pomocí hmotnostní spektrometrie



● Proteomika

= analýza proteomu buňky/tkáně pomocí hmotnostní spektrometrie



● Experiment na prasatech – podání steroidních hormonů

- 3 skupiny prasat (stáří cca 4 měsíce), prasničky, kanečci kastrování i nekastrování
- 9 kontrolní skupina
- 9 nandrolon, IM podání, 2 mg/kg (Myodine 25)
- 9 testosteron, IM podání, 4 mg/kg (Sustanon 250)
- 5 podání po 5 dnech

● Experiment na prasatech – podání steroidních hormonů

Analyzované tkáně/tělní tekutiny:

- Játra
- Srdce
- Ledvina
- Sval

- Krevní plasma



● Experiment na prasatech – podání steroidních hormonů

Analyzované tkáně/tělní tekutiny:

- Játra
 - Srdce
 - Ledvina
 - Sval

 - Krevní plasma
- homogenizace tkáně, izolace proteinů, redukce, alkylace, enzymatické štěpení, MS měření, databázové prohledávání, vyhodnocení dat



● Experiment na prasatech – podání steroidních hormonů

Analyzované tkáně/tělní tekutiny:

- Játra
 - Srdce
 - Ledvina
 - Sval

 - Krevní plasma
- homogenizace tkáně, izolace proteinů, redukce, alkylace, enzymatické štěpení, MS měření, databázové prohledávání, vyhodnocení dat
- Odstranění abundantních proteinů (albumin, IgG), izolace proteinů, redukce, alkylace, enzymatické štěpení, MS měření, databázové prohledávání, vyhodnocení dat

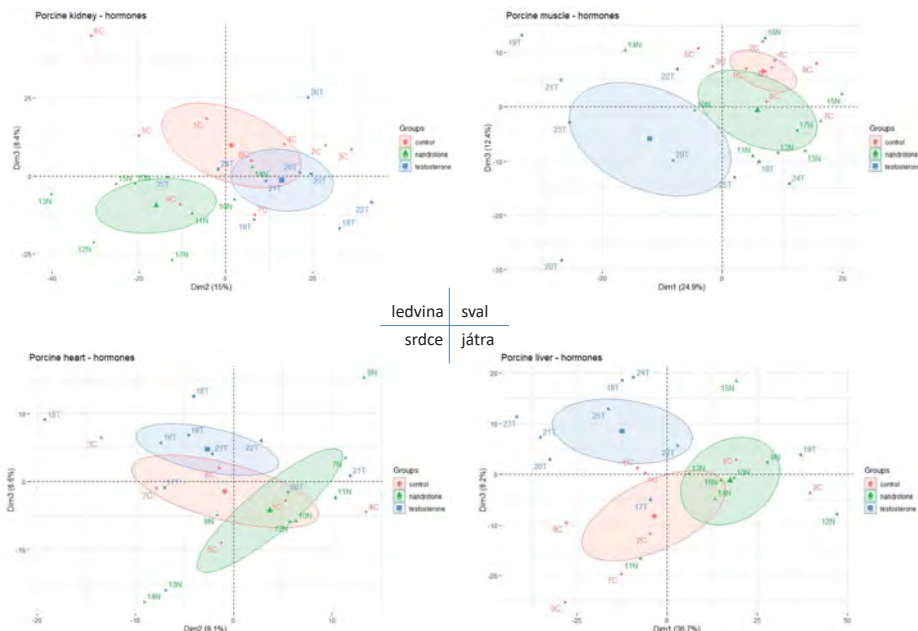


● Výstupy

- bez znalosti konkrétních proteinů – míra exprese (množství) proteinů

1) PCA analýza – podobnost/rozdílnost mezi skupinami

PCA analýza

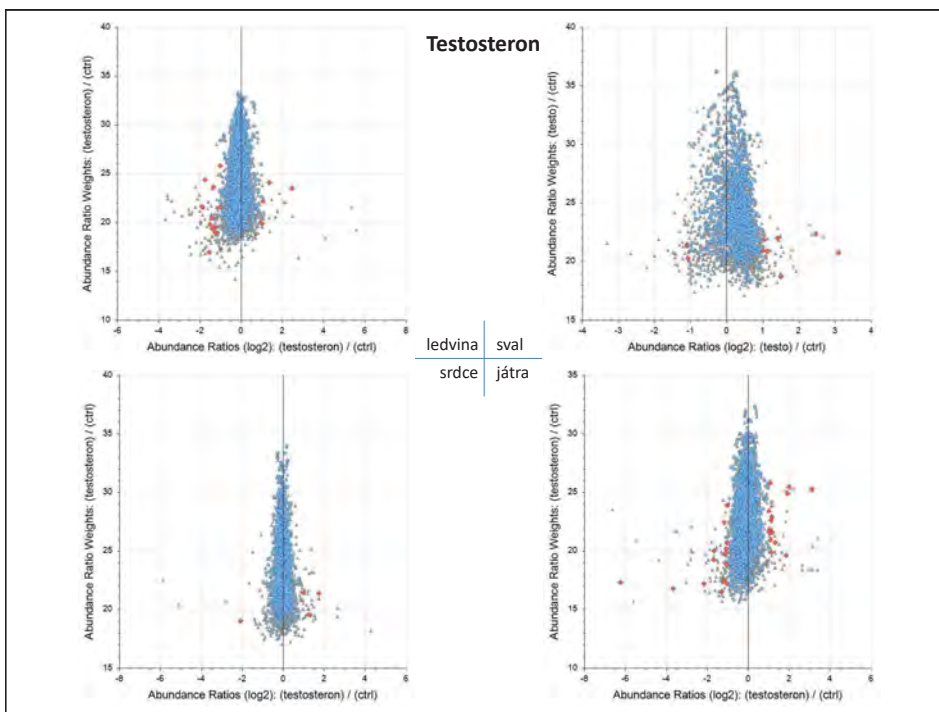
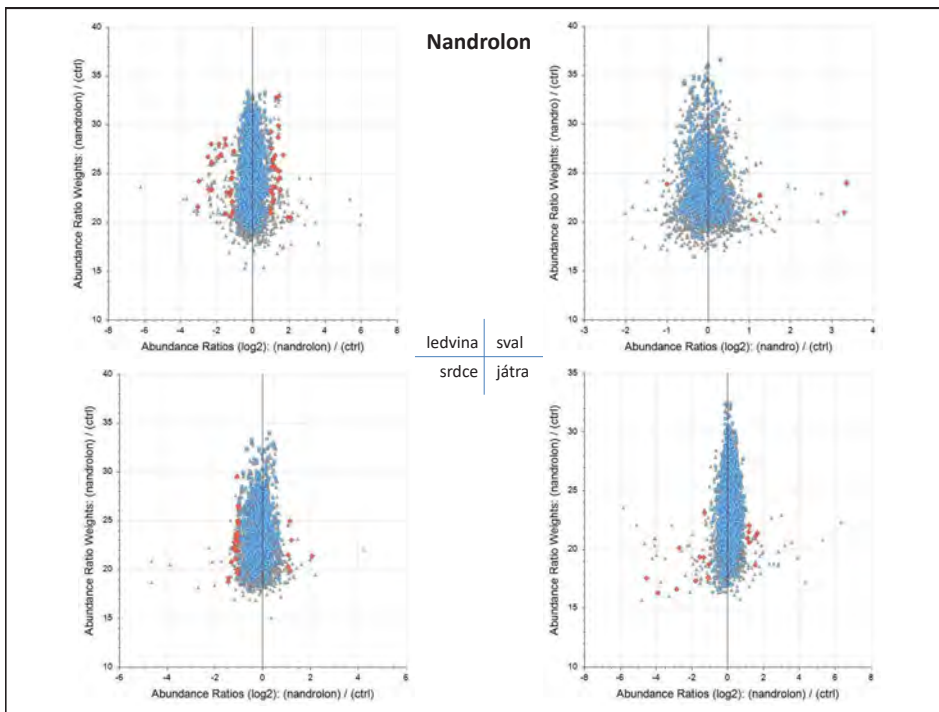


● Výstupy

- bez znalosti konkrétních proteinů – míra exprese (množství) proteinů

1) PCA analýza – podobnost/rozdílnost mezi skupinami

2) Scatter plot – změny exprese – poměry expozice/kontrola nad 2 a pod 0,5 biologicky relevantní



🟡 Výstupy

- konkrétní proteiny

			nandro	testos
1) sval	↗	glycogenin-1 isoform 1	ratio vs ctrl 2,15	2,22
	↘	troponin I	ratio vs ctrl 0,57	0,52
	↘	troponin T	ratio vs ctrl 0,62	0,69
	↘	cytochrome b-c1 complex	ratio vs ctrl 0,50	0,65
2) srdce	↗	alpha-1-antichymotrypsin	ratio vs ctrl 4,22	3,34
	↗	cadherin-2	ratio vs ctrl 2,31	1,61
	↗	hemopexin	ratio vs ctrl 2,23	1,29
	↘	myomesin 3	ratio vs ctrl 0,45	0,72
	↘	collagen alpha-2(VI)	ratio vs ctrl 0,47	0,57
	↘	myosin binding protein C3	ratio vs ctrl 0,48	0,76

● Výstupy

- konkrétní proteiny

			nandro	testos	
3) játra	↗	metallothionein	ratio vs ctrl	3,18	1,24
	↗	carbonyl reductase [NADPH]	ratio vs ctrl	1,57	8,71
	↗	creatine kinase M-type	ratio vs ctrl	1,11	2,28
	↘	cytochrome P-450	ratio vs ctrl	0,15	0,32
	↘	aquaporin-1	ratio vs ctrl	0,07	0,08
4) ledvina	↗	metallothionein-3	ratio vs ctrl	4,34	0,67
	↗	fibrinogen C-terminal domain	ratio vs ctrl -	2,93	1,35
	↗	fibrinogen beta chain	ratio vs ctrl	2,22	1,32
	↗	joining chain of IgA and IgM	ratio vs ctrl	2,93	2,01
	↘	membrane-assoc. transporter	ratio vs ctrl	0,18	0,59
	↘	uncharacterized protein	ratio vs ctrl	0,18	0,40
	↘	cytochrome P-450	ratio vs ctrl	0,21	0,75



Jan Gebauer
Kamil Šťastný
Kristína Tošnerová
Iva Bartejsová

Děkuji za pozornost...

Nové poznatky a metody k prokazování zneužívání anabolických steroidů ve výkrmu hospodářských zvířat, cíleně prasat

VÚVeL ACADEMY - Brno
- 2021 -

