

**Edice
Chemické
Lístky**



Michal JURÁŠEK a Pavel DRAŠAR,

editoři sborníku

ORGANICKÉ

PŘÍRODNÍ LÁTKY

v zrcadle časopisu

CHEMICKÉ LISTY

2001-2005

Česká společnost chemická

a

redakce časopisu Chemické listy

Praha

2026

Dear readers, please cite the information from this collection as the original paper in Chem. Listy, as listed on the top of the first page of every contribution, e.g.

Author X.: Chem. Listy 111, 23-57 (2000).

±†òŠyŋ ōúŠy†ŋλΣ ŌλúdzúŤ LJN2ăŋY λy†2NŸI-ŌŠ î ú2K2ú2 äö2NŸŋŋdz 2I-ŋ2 LJăŌ2Řyŋ
őf†yŤŋ Ō /KŤYΦ [λăúèΣ 2I-ŋ 2Ť dzŌŠŘŤy2 Ō K2NŸŋ ō†ăúλ LJNŌyŋ äúN†yŋè ŋI-ŌŘŤK2
LJŋŋăLJŠŌŋdzŋ yŋ-LJŋŋ

! dzú2NŸ - ΦY /KŤYΦ [λăúè 111Σ нопрт онлллуŋ



Organické přírodní látky v zrcadle časopisu Chemické listy, 2001-2005

Editori: doc. Ing. Michal **JURÁŠEK, PhD.** a prof. RNDr. Pavel **DRAŠAR, DSc.**

Seznam autorů jednotlivých příspěvků je uveden na str. 279.

Typografická úprava: Claudie JIRÁTOVÁ, Ing. Marie SETNIČKOVÁ, Ing. Radmila ŘÁPKOVÁ.

Fotografie: RNDr. Zdeněk Putz CSc.

Vydání publikace bylo schváleno redakční radou časopisu Chemické listy.

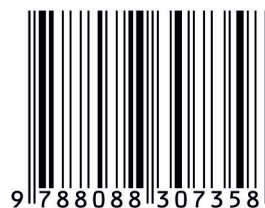
Vydala: Česká společnost chemická.

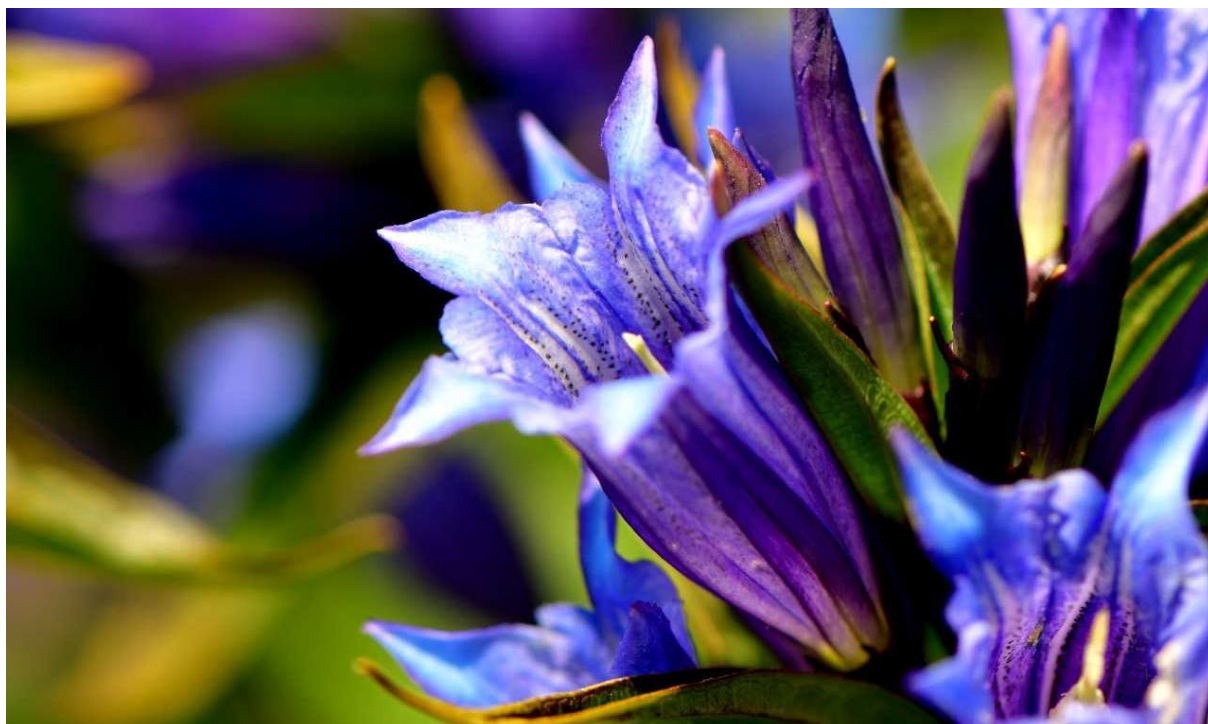
Vydání první, počet stran 279, ediční číslo 12568-2026-05.

© Česká společnost chemická, redakce časopisu Chemické listy, Praha 2026.

ISBN 80-88307-35-8

ISBN elektronické verze (formát PDF) 978-80-88307-35-8





ISOPRENOIDY V ATMOSFÉŘE Zbyněk Večeřa	1
SACHAROSA JAKO PRŮMYSL OVÁ SUROVINA Jitka Moravcová	7
DERIVÁTY ELIPTICINU S CÍLENÝM PROTINÁDOROVÝM ÚČINKEM Marie Stiborová, Eva Frei	17
JAKON (<i>Smallanthus sonchifolius</i>) A MAKA (<i>Lepidium meyenii</i>), TRADIČNÍ ANDSKÉ PLODINY JAKO NOVÉ FUNKČNÍ POTRAVINY NA EVROPSKÉM TRHU Kateřina Valentová, Jan Frček, Jitka Ulrichová	24
RESVERATROL Jan Šmidrkal, Vladimír Filip, Karel Melzoch, Irena Hanzlíková, Daniela Buckiová, Bohdan Křisa	32
BRASSINOSTEROIDY Ladislav Kohout	40
POLYFENOLOVÉ LÁTKY PIVA - PŘÍROZENÉ ANTIOXIDANTY Jaroslav Čepička, Marcel Karabín	41
FYTOESTROGENY VE VÝŽIVĚ - PŘINÁŠEJÍ UŽITEK NEBO RIZIKO? Jitka Moravcová, Tereza Kleinová	47
NÁVRAT HOUBY, JEŽ DALA VZNIKOUT JMÉNU TRICHOTHECENY Martin Žabka, Alexandr Jegorov	55
DEOXYFLUORGLUKOSA, MEZNÍK VE VÝVOJI POZITRONOVÉ EMISNÍ TOMOGRAFIE (HISTORIE JEDNOHO VÝZKUMU) Josef Pacák, Miloslav Černý	59
METABOLISMUS BILIRUBINU A ZPŮOBY ELIMINACE JEHO TOXICITY Libor Vítek, Lucie Sedláčková, Pavel Branny, Tomáš Ruml	63
PŘÍRODNÍ LÁTKY V PREVENCI ONEMOCNĚNÍ TRÁVICÍHO TRAKTU Martin Modrianská, Kateřina Valentová, Věra Přikrylová, Daniela Walterová	68
BIOLOGICKÁ A CHEMICKÁ VARIABILITA MAKY A JAKONU Aleš Lebeda, Ivana Doležalová, Kateřina Valentová, Marta Dziechciarková, Marie Greplová, Hana Opatová, Jitka Ulrichová	76
STEROIDY NA ZAČÁTKU JEDENADVACÁTÉHO STOLETÍ Alexander Kasal	85
GIBERELINY, NAKIENONY A INKRUSTOPORINY: RADOSTI A STRASTI SYNTÉZ MALÝCH, VYSOCE FUNKCIONALIZOVANÝCH MOLEKUL Milan Pour	106
PŘÍRODNÍ LÁTKY OVLIVŇUJÍCÍ MEZIBUNĚČNOU KOMUNIKACI Hana Forejtníková, Renata Kubínová	115
UNIKÁTNE LIPIDY A ŠTRUKTÚRY MEMBRÁN ARCHAEBAKTÉRIÍ Ľubomíra Čuboňová, Peter Migáň	123
KYSELINA BETULINOVÁ: PERSPEKTIVNÍ CYTOSTATIKUM Jiří Patočka, Marie Stiborová	128

PŘÍJEM, BIOLOGICKÁ DOSTUPNOST A METABOLISMUS ROSTLINNÝCH POLYFENOLŮ U ČLOVĚKA Jiří Slanina, Eva Tábořská	131
BÍLKOVINY HLÍZ BRAMBORU (<i>SOLANUM TUBEROSUM</i> L.) - KLASIFIKACE, CHARAKTERISTIKA, VÝZNAM Jan Bárta, Vladislav Čurn	138
XANTHOMOL – CHMELOVÁ PRYSKYŘICE NEBO POLYFENOL? Pavel Hořta, Pavel Dostálek, Gabriela Basařová	144
CHYTRÝ GLUKAN Václav Větvíčka	150
MANNICOVA A PŘÍBUZNÉ REAKCE V TOTÁLNÍ SYNTÉZE ALKALOIDŮ Josef Hájíček	151
CHEMIE MUŽSKÉ SEXUALITY Kateřina Valentová, Pavla Entnerová, Jaroslava Urbaníková, Vilím Šimánek	167
TRENDY V TOTÁLNÍ SYNTÉZE ALKALOIDŮ Josef Hájíček	178
OXAZOLIDINOVÉ DERIVÁTY EFEDRINU Martina Astrová, Ladislav Kurc, Libor Červený	198
FUKOSIDASY A OLIGOSACHARIDY OBSAHUJÍCÍ FUKOSU Eva Benešová, Michaela Marková, Petra Lipovová, Blanka Králová	204
ČERVENÉ A MODŘE ZBARVENÉ BRAMBORY - VÝZNAMNÝ ZDROJ ANTIOXIDANTŮ V LIDSKÉ VÝŽIVĚ Jaromír Lachman, Karel Hamouz, Matyáš Orsák	210
OBSAH RESVERATROLU V ZELENINĚ A OVOCI Irena Kolouchová, Karel Melzoch, Jan Šmidrkal, Vladimír Filip	219
KLASIFIKAČNÍ SYSTÉM LIPIDŮ Arnošt Kotyk	223
STRUKTURNÍ BOHATSTVÍ A BIOLOGICKÝ VÝZNAM LIGNANŮ A JIM PŘÍBUZNÝCH ROSTLINNÝCH FENYLPROPANOIDŮ Juraj Harmatha	228
POLYSACHARIDY, JEJICH VÝZNAM A UPLATNĚNÍ Jana Čopíková, Andrii Synytsya	239
STRUKTURA A VLASTNOSTI PŘÍRODNÍCH HUMINOVÝCH LÁTEK TYPU OXIHUMOLITU Lenka Veselá, Martin Kubal, Josef Kozler, Petra Innemanová	240
BIOSYNTÉZA, SEKRECE A DEGRADACE INSULINU Lenka Žáková, Jiří Jiráček	247
BIOCHEMICKÉ A TOXIKOLOGICKÉ ASPEKTY ETIOLOGIE BALKÁNSKÉ ENDEMICKÉ NEFROPATIE Marie Stiborová, Jiří Patočka, Eva Frei, Heinz H. Schmieser	257
PŘÍRODNÍ BAREVNÉ LÁTKY Jana Čopíková, Michal Uher, Oldřich Lapčík, Jitka Moravcová Pavel Drašar	264



ISOPRENOIDY V ATMOSFÉŘE

ZBYNĚK VEČEŘA

Ústav analytické chemie, Akademie věd České republiky, Veveří 97, 611 42 Brno, e-mail vecera@iach.cz

Došlo dne 27.IV.2000

Klíčová slova: isoprenoidy, vznik, chemické reakce isoprenoidů v atmosféře, stanovení

Obsah

1. Úvod
2. Atmosférické emise isoprenoidů
3. Reaktivita isoprenoidů a vliv jejich reakčních produktů na lesní porosty
4. Historické mezníky při stanovení isoprenoidů v ovzduší
5. Závěr

1. Úvod

Terpeny jsou přírodní uhlovodíky, vznikající jako metabolity některých rostlin, převážně stromů, a zejména jehličnanů^{1,2}. Ty, které významně ovlivňují chemické procesy v atmosféře (obr. 1), se vyznačují nepříliš vysokými body varu (155–185 °C) a nízkou polaritou molekuly, která je příčinou jejich relativně vysoké těkavosti³. Tyto sloučeniny patří k rozsáhlé skupině rostlinných látek (isoprenoidů), do níž zahrnujeme i zdánlivě tak rozdílná chemická individua, jako jsou kaučuk, karoten a kyselina giberelová. Zvláštní postavení mezi isoprenoidy má isopren.

Systematika terpenové chemie dělí terpeny na monoterpeny, seskviterpeny, diterpeny, triterpeny, tetraterpeny, sesterterpeny a polyterpeny. Tyto názvy vznikly historickým vývojem a označení vychází ze sloučenin, které obsahují dvě isoprenové jednotky. Monoterpeny obsahují dvě isoprenové jednotky, diterpeny čtyři isoprenové jednotky, triterpeny šest isoprenových jednotek. Seskviterpeny mají tři isoprenové jednotky a sesterterpeny pět isoprenových jednotek. Sloučeniny s vyšším počtem uhlíků než patnáct mají vysoké body varu a minimální těkavost. V přírodě lze také nalézt skupinu polyterpenů představovanou kaučukem a gutaperčou, což jsou polymery se zanedbatelnou tenzí par.

Biochemie tvorby isoprenoidů byla, a stále je rozsáhle zkoumána a jsou známy některé detaily jejich biosyntézy^{1,2}. Při těchto reakcích lze dospět až k iridoinovým alkaloidům, včetně kyseliny abscisové. Isopren se tvoří v chloroplastu působením isoprensyntasy^{4–6} na 3,3-dimethylallyl-difosfát v přítomnosti hořčnatých iontů.

Stále nevíme, proč některé rostliny terpeny produkují. Předpokládá se, že jde o určitou formu chemické obrany

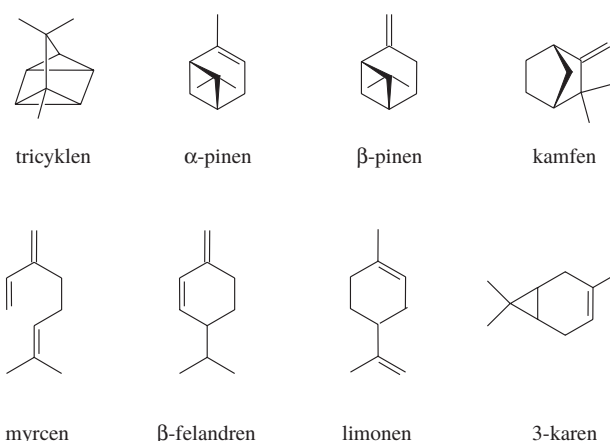
rostlin před hmyzem a cizopasníky⁷. Tyto sloučeniny působí i jako chuťová bariéra pro býložravce^{8–10}. Produkci isoprenu rostlinami nelze v současné době uspokojivě vysvětlit. Podle současných poznatků jde o metabolickou poruchu, nemající přímou souvislost s biosyntézou ostatních isoprenoidů.

Některé terpeny mají praktické využití. V kosmetice a v lékařství tvoří složky zvláštní skupiny léčiv s antibakteriálními účinky (pineny, limonen, felandren, kamfen, karen). Na terpeny bohaté rostlinné silice se průmyslově získávají z rostlinného materiálu, například z borové kůry nebo z terpentýnu destilací s vodní parou¹¹. V etherických olejích pocházejících z jehličnanů převládají monoterpeny¹¹. Jsou to zejména α -pinen a β -pinen, v menší míře limonen, β -felandren, 3-karen a kamfen, vzácněji jsou v nich obsaženy tricyklen, terpinolen, α -terpinen a γ -terpinen, případně bicyklický uhlovodík ze skupiny seskviterpenů, známý pod názvem kadinen. V těchto kapalných silicích je možno nalézt i kyslíkaté deriváty monoterpenů, jako jsou 1,8-cineol (eukalyptol), kafr, linalool, citronelol a bornyl-acetát. Vzácně se v přírodě vyskytují sabinen (v jalovci), thujen (v thuji), nebo santen (v sibiřské jedli)¹².

2. Atmosférické emise isoprenoidů

Těkavé isoprenoidy patří ke skupině biogenních sloučenin, které je možné obecně zařadit mezi těkavé (VOC) nebo polotěkavé (SVOC) organické sloučeniny. V globálním měřítku je produkce tohoto druhu isoprenoidů významná¹³ a zásadním způsobem ovlivňuje chemii atmosféry. Emise z rostlin principiálně kontrolují oxidační kapacitu kontinentální oblasti troposféry. Tyto biogenní uhlovodíky jsou prekurzory troposférického neantropogenního ozonu¹⁴, ovlivňují koncentrace OH radikálů a oxidu uhelnatého v atmosféře^{14–16}. Isoprenoidy byly také identifikovány¹⁷ jako významné výchozí reaktanty při okyselování životního prostředí.

Zejména lesní porosty emitují do atmosféry velká množství těchto reaktivních uhlovodíků. Terpeny a isopren se ze živých i z odumřelých stromů uvolňují do atmosféry v takové



Obr. 1. Strukturální vzorce nejdůležitějších těkavých terpenů

vém množství, že i přes narůstající průmyslové znečištění představují hlavní zdroj uhlíku v atmosféře. Biogenní emise řádově převyšují emise antropogenně emitovaných organických sloučenin¹⁸.

Jako první se pokusili odhadnout produkci biogenních sloučenin Rasmussen s Wentem¹⁹ v roce 1965. Podle jejich odhadu se do atmosféry uvolňuje ročně 432 Tg uhlíku/rok, který pochází z biogenně produkovaných organických sloučenin. V následujícím období byly činěny pokusy zpřesnit a strukturovat tyto emise^{13,20–23}. Podle posledních poznatků emise těchto sloučenin odpovídají ekvivalentu 1150 Tg uhlíku za rok²⁴ a jsou strukturovány následovně: 503 Tg uhlíku/rok (isopren), 127 Tg uhlíku/rok (monoterpeny), 260 Tg uhlíku/rok (reaktivní organické těkavé látky), zbývající část emisí, 260 Tg uhlíku/rok, tvoří ostatní organické sloučeniny.

Kromě toho, že přítomnost terpenů a isoprenu v atmosféře ovlivňuje obsah fotochemických oxidantů, kyslíčnicku uhelnatého a vodíku, je tato skupina uhlovodíků spojována s atmosférickým úkazem, nazvaným modrý opar (Blue Haze), jehož existenci dokládají četné historické názvy, např. v USA „Blue Ridges” nebo „Blue Mountains” v Austrálii. Jedná se o modře zbarvený opar aerosolového charakteru vznikající někdy v létě za jasných bezvětrných dnů nad lesy, případně nad lukami, v místech vzdálených od míst průmyslového znečištění. Tento jev poprvé diskutoval Went²⁵, který se domníval, že částice modrého aerosolu jsou bituminosního a asfaltického charakteru a vznikají oxidačními reakcemi par terpenů v inverzní vrstvě vzduchu. V současnosti předpokládáme, že modrý opar je přímo pozorovatelným důsledkem fotochemických reakcí probíhajících v atmosféře^{26–27}, podle následujícího schématu: seskviterpeny reagují s OH radikály, NO₃ radikály a ozonem²⁶ v reakcích, jejichž produkty jsou oxygenované formy seskviterpenů. Tyto sloučeniny jsou méně těkavé a shlukují se do mikroskopických částic organického aerosolu (biogenní aerosol).

Struktura biogenních emisí isoprenoidů je geneticky podmíněna^{28,29}. Bylo však zjištěno, že ani v rámci jednoho ekotypu nelze extrapolovat složení biogenních sloučenin v jednom druhu rostlin do geneticky příbuzného druhu rostlin. Jako příklad lze uvést dub červina (*Quercus ilex*), který, na rozdíl od ostatních druhů dubu, v jejichž emisních charakteristikách převládá isopren, emituje do okolí významná množství monoterpenů³⁰. Při prvním přiblížení však platí, že opadavé druhy stromů uvolňují zejména isopren, jehličnany uvolňují převážně terpeny³¹. V lokálním měřítku mají vliv na obsah a zastoupení isoprenoidů v lesním vzduchu tyto faktory: botanické složení biotopu, množství isoprenoidů akumulovaných ve vegetaci a jejich těkavost, vegetační období, denní doba, meteorologické podmínky, pedologické poměry, teplota „listů“ a intenzita osvětlení^{32,33}. V závislosti na těchto parametrech se koncentrace terpenů v ovzduší mění v rozmezí tisícín až několika jednotek ppb(v/v). Maximální, jednotkové ppb(v/v) obsahy terpenů (α -pinenu) byly naměřeny v lesním vzduchu v letních měsících těsně před východem slunce, případně po západu slunce a mohou být až desetkrát vyšší než koncentrace denní²⁹. V lesním ovzduší lze nalézt i relativně vysoké koncentrace β -pinenu, limonenu, ale i dalších terpenů, jako jsou kamfen, 3-karen, myrcen, tricyklen, 1,8-cineol. Základním faktorem, který ovlivňuje okamžité emise terpenů z rostlin, je teplota. Emise terpenů jsou na teplotě exponenciálně závislé. Množství emisí a rychlost jejich uvolňování

souvisí s biologickými parametry porostu, stupněm jeho poškození, se strukturální integritou olejnatých buněk a živých žilných listů³¹ a lze je v některých případech jednoznačně korelovat s fotosyntetickou asimilací a transpirací oxidu uhlíkatého rostlinami³¹. Emise isoprenu jsou ovlivňovány aktuální intenzitou světla a jeho spektrálním složením³⁴, proto koncentrace isoprenu v lesním vzduchu vykazují výrazné denní fluktuace, jsou maximální během dne a zanedbatelné v nočních hodinách³⁵. Je překvapivé, že obdobně jako isopren se chovají i monoterpeny s thujanovým skeletem³⁵, sabinén a thujén.

3. Reaktivita isoprenoidů a vliv jejich reakčních produktů na lesní porosty

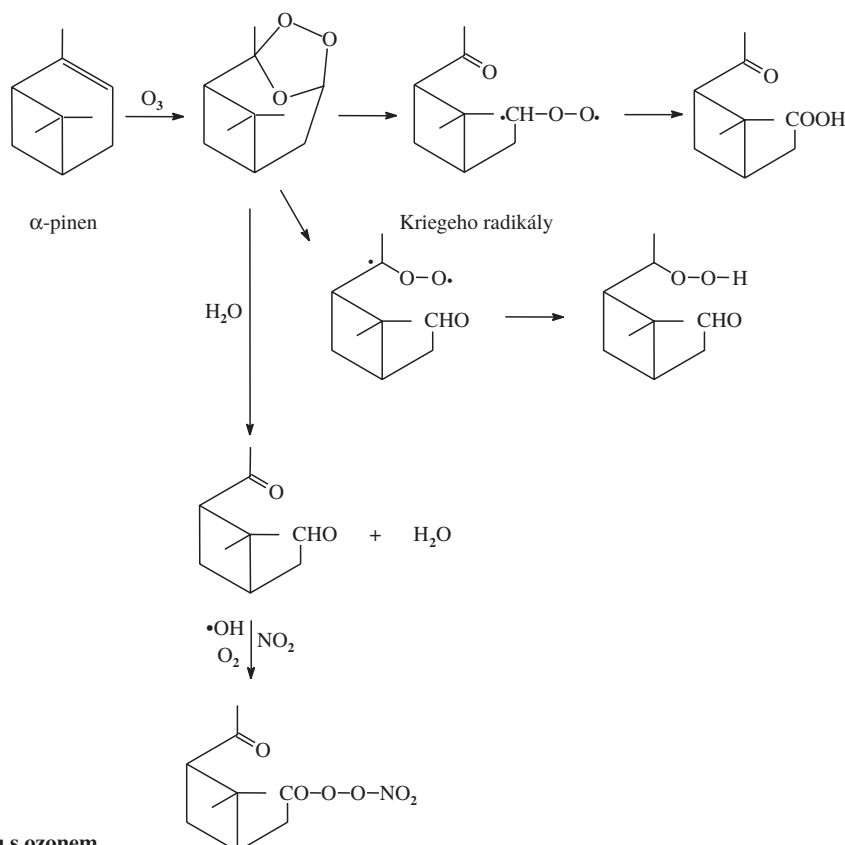
Reaktivita isoprenu a terpenů je založena zejména na elektrofilních a radikálových adičních reakcích dvojné vazby C=C. Některé terpeny jsou natolik citlivé k adičním reakcím, že například α -terpinen, obsahující dvě konjugované dvojné vazby v šestičlenném kruhu, reaguje již při běžných teplotách se vzdušným kyslíkem za vzniku cyklického peroxidu, s triviálním názvem askaridol. Reakce ozonu s isoprenem nebo terpeny vedou ke vzniku hydroxylových radikálů¹⁷ a nestabilních ozonidů^{15,17,35–38}. Ozon se aduje na dvojnou vazbu za vzniku primárního ozonidu, který následně přechází na sekundární ozonid, ve kterém je kyslíkový a peroxidický můstek lokalizován v místě, kde před reakcí byla dvojná vazba mezi uhlíkovými atomy¹². V přítomnosti molekuly vody se sekundární ozonid štěpí, a v závislosti na poloze dvojné vazby vznikají karbonylové nebo aldehydické sloučeniny a peroxid vodíku^{12,35}. Reakční schéma α -pinenu s ozonem je uvedeno na obrázku 2.

V nočních hodinách reagují těkavé isoprenoidy podle dosud ne zcela objasněného chemického mechanismu, s NO₃ radikály. Z experimentů, které prováděl Corchnoy s Atkinsonem³⁷ vyplývá, že reaktivita α - a β -pinenů, 3-carenu, sabinenu, limonenu, myrcenu, ocimenu, γ -terpinenu a α -felandrenu s OH radikály, ozonem a radikály NO₃ je srovnatelná¹⁶. Výjimku mezi sledovanými terpeny tvoří α -terpinen, u kterého reakce s ozonem dominuje při jeho odstraňování z troposféry.

V souvislosti s isoprenoidy emitovanými lesními porosty byla prokázána tvorba značného množství peroxidu vodíku a organických peroxidů^{35,38–40}. Tyto peroxosloučeniny mají výrazné fytotoxické účinky^{40–42} a způsobují patologické změny ve struktuře listů a jehličí³⁹. Peroxid vodíku vyvolává závažné deformace⁴⁰ mezofylových buněk listů, které se projevují zvětšením plochy mezibuněčného prostoru a následným zvýšením emisí biogenních sloučenin. Podle Peterse⁴³ působení peroxidu vodíku a organických peroxidů může způsobovat vážné škody na lesní vegetaci. Expozice smrkového jehličí kyselé mlze obsahující peroxid vodíku generuje katabolické efekty v primárním jehličí, které se projevují poruchou vodní rovnováhy rostliny^{40,41} a mohou mít v případě nedostatku vláhy fatální následky na lesní porosty⁴⁴.

Kromě toho, že přítomnost peroxidu vodíku v ovzduší je a priori nebezpečná pro rostliny, molekuly peroxidu vodíku reagují⁴⁵ s ionty dvojmocného železa v tzv. Fentonově reakci



Obr. 2. Reakční schéma α -pinenu s ozonem

produkující s vysokým výtěžkem mimořádně reaktivní hydroxylový radikál. Reakce probíhá již při běžných teplotách a nevyžaduje působení ultrafialového záření. Ionty dvojmocného železa⁴⁵ jsou fotoredukci regenerovány z komplexů trojmocného železa s peroxidem vodíku, a tak může Fentonova reakce představovat nový zdroj generující hydroxylové radikály do biosféry. Pravděpodobnost průběhu Fentonovy reakce lze v přírodě pozitivně korelovat zejména s obsahem isoprenoidů v ovzduší a lze očekávat, že reakce bude probíhat zejména v místech s intenzivním automobilovým provozem, při kterém se uvolňuje do troposféry železo v důsledku otěru točivých součástí motorů.

4. Historické mezníky při stanovení isoprenoidů v ovzduší

Přestože spolehlivé stanovení isoprenu a terpenů v ovzduší má v současném období mimořádný význam a vysokou prioritu, není problematika jejich stanovení beze zbytku dořešena. Chyba stanovení při analýze emisí isoprenu současnými analytickými postupy je významná^{46,47}. Publikované údaje o obsahu ostatních isoprenoidů v ovzduší jsou diskutabilní²⁴, jsou s největší pravděpodobností podhodnoceny.

Podle dostupné literatury, první historicky doložitelné pokusy, systematicky prováděné za účelem stanovení biogenních sloučenin v ovzduší byly učiněny Rasmussen s Wentem v roce 1964 (cit.¹⁹). Autoři sledovali obsahy terpenů v lesním vzduchu. Jejich měření přináší první kvantitativní údaje

o aktuální koncentraci některých rostlinných těkavých látek ve vzduchu i zajímavá zjištění, že produkce biogenních látek je spojena s vývojovým stádiem dřevin, zásahy člověka do ekosystému a meteorologickými podmínkami. Analýza se prováděla přímým nástřikem 5 ml okolního vzduchu do plynového chromatografu (GC) Perkin Elmer 800, umístěném v mobilní laboratoři, který obsahoval náplňovou kolonu se stacionární fází Carbowax 20M. Detekce jednotlivých sloučenin byla prováděna plamenově ionizačním detektorem (FID). Tato metodika umožňovala sledovat těkavé rostlinné látky ve volné přírodě na úrovni 10 ppb(v/v). Rasmussen s Wentem prokázali, že v ovzduší je, kromě sloučenin s terpenovým skeletem (α -pinen, β -pinen, 3-karen, limonen, myrcen), také isopren. Tento experiment probíhal současně i v Holandsku¹⁹. Vzduch však nebyl analyzován na místě odběru, ale po transportu v polypropylenových sáčkách do laboratoře, odběrem injekční stříkačkou a dávkováním do plynového chromatografu. Přímý nástřik analyzovaného vzduchu do plynového chromatografu byl použit v následujícím období několikrát. V roce 1972 Rasmussen²¹ analyzoval biogenní sloučeniny po nástřiku 1–5 ml plynného vzorku do plynového chromatografu s plamenově ionizačním detektorem.

Ke snížení detekčního limitu při analýze isoprenoidů v ovzduší jehličnatých lesů vypracovali Whitby s Coffeyem⁴⁸ techniku, která umožňovala dávkovat do plynového chromatografu stovky mililitrů vzduchu. Analytický postup je založen na kryofokusaci analytů z nadávkovaného plynného vzorku v nerezové trubici při teplotě kapalného dusíku. Po kryofokusaci následoval ohřev trubice a separace v náplňové nerezové

koloně se stacionární fází OV-101. Tento postup, ve spojení s plamenově ionizační detekcí, umožnil monitorovat sub-ppb (v/v) množství isoprenoidů v plynném vzorku.

Přestože je metodika přímého nástřiku analyzovaného vzduchu do plynového chromatografu jednoduchá, snaha o zvýšení počtu identifikovaných isoprenoidů v jednom vzorku vedla k téměř výhradnímu používání kapilárních plynově chromatografických kolon, jejichž použití přímý nástřik plynného vzorku významně omezuje. V této souvislosti se při vzorkování ovzduší začala aplikovat technika adsorpce na tuhých sorbentech. Sloučeniny jsou ze sorbentů extrahovány rozpouštědly, případně jsou desorbovány teplem ve speciálních desorpčních aparaturách a analyzovány plynovou chromatografií. Poprvé se sorbenty experimentoval Hedin^{49,50}, který stanovoval těkavé biogenní látky v prostředí bavlníkových plantáží. Analyzovaný vzduch prosával přes Chromosorb 102, adsorbované sloučeniny byly extrahovány *n*-pentanem a extrakt byl analyzován na plynovém chromatografu s hmotovou detekcí (MS). Jako první separoval biogenní sloučeniny na kapilární koloně (stacionární fáze OV-17), která umožnila identifikovat v ovzduší⁵⁰ celkem 73 sloučenin, včetně α -pinenu, limonenu, myrcenu a β -caryophylenu.

Extrakce adsorbovaných sloučenin kapalinou je časově náročná a byla používána při analýze biogenních sloučenin v ovzduší výjimečně, například při vývoji pasivních monitorů monoterpenů v pracovním prostředí při zpracování dřeva⁵¹.

V roce 1977 Holzer⁵² jako první aplikoval při analýze organických sloučenin emitovaných biogenními a antropogenními zdroji adsorpčně-tepelně-desorpční techniku. Při vzorkování ovzduší, které bylo do laboratoře transportováno v 35 litrovém kontejneru, použil Tenax GC, Carboxpack BHT nebo Amborsorb XE-340. Analyty byly ze sorbentů tepelně desorbovány v upraveném injektoru plynového chromatografu a ve spojení s GC-MS analyzovány. Výhradně pro monitorování obsahu terpenů a isoprenu v ovzduší sloužila adsorpčně-tepelně-desorpční technika v roce 1979 Holdrénovi⁵³, který porovnával dva způsoby vzorkování biogenně emitovaných sloučenin z ovzduší: kryogenický a adsorpci (Tenax GC). Oba poskytovaly srovnatelné výsledky. Vzorkování do kryptotrapu i přes adsorpční trubičku se neprovádělo přímo v místě měření, ale z 6-litrového nerezového kanistru, ve kterém byl monitorovaný vzduch shromažďován a transportován do laboratoře k analýze. Látky byly separovány ve skleněné SE-30 kapilární koloně a v ocelové náplňové koloně s Durapakem-Low K. Při detekci a identifikaci byl použit MS detektor. Minimální detegovatelné množství bylo stanoveno na méně než 10 ppt(v/v). Při těchto experimentech byla poprvé testována hypotéza o vlivu ozonu přítomného v analyzovaném vzduchu na výsledky stanovení obsahu biogenních látek olefinického charakteru. Vzájemná souvislost mezi obsahem ozonu v atmosféře a spolehlivostí výsledků nebyla potvrzena, byla však nalezena korelace pro reakci těchto sloučenin s oxidy dusíku.

Přestože se od konce sedmdesátých let při stanovení biogenních sloučenin v ovzduší používaly výhradně kapilární kolony, Yokouchi²⁹ prokázal, že vhodnou metodikou (tandem GC-MS, „single ion mode“ detekce), lze spolehlivě sledovat sub-ppb(v/v) koncentrace monoterpenů v ovzduší i v případě, že je použita náplňová kolona. Vzorkování probíhalo na kolonky s Tenaxem GC, ze kterého byly analyty tepelně desorbovány do skleněné náplňové kolony se směsnou stacionární fází silikon DC 200 s Bentonem 34. V roce 1982 Arnts⁵⁴ se

spolupracovníky analyzovali biogenní sloučeniny po odběru vzduchu do 20 litrového Tedlarového vaku pokrytého černou polyethylenovou fólií, jehož obsah byl k zabránění reakcí s ozonem dopován oxidem dusnatým. Po transportu do laboratoře bylo 500 ml vzduchu z Tedlarového vaku kryogenicky zakonzentrováno v nerezové kapiláře a podrobeno plynově chromatografické analýze s plamenově ionizační detekcí. Pro separaci použili WCOT kolonu se stacionární fází SE 30. Tento postup umožnil analyzovat obsah biogenních uhlovodíků v ovzduší na úrovni desítek ppt(v/v). Výsledky nepotvrdily negativní vliv oxidu dusnatého ani vliv časového prodlžení mezi vzorkováním a analýzou na spolehlivost stanovení.

Při leteckém i pozemním odběru vzorků vzduchu, které byly prováděny v letech 1977–1980 v rámci sledování vlivu spalování deštného pralesa na životní prostředí v Brazílii, vyhodnocovali Greenberg s Zimmermanem⁵⁵ také emise isoprenu a některých monoterpenů. Při této kampani používali k odběru vzduchu 4 litrový nerezový kanistr, ze kterého byly vzorky vzduchu po transportu k analýze kryofokusovány v nerezové smyčce naplněné skleněnými kuličkami a ponořené v chladicí lázni (kapalný kyslík nebo argon). Kondenzát byl po zahřátí injektován do plynového chromatografu a po separaci v kapilární koloně SE-30 byly jednotlivé píky detegovány plamenově ionizačním nebo MS detektorem. Bylo prokázáno, že vzorkování vzduchu do nerezových kanistrů, s výjimkou uhlovodíků obsahujících ve své molekule kyslík, je stejně spolehlivé jako vzorkování na Tenax, do teflonového nebo Tedlarového vaku⁵⁴.

Při sledování emisí isoprenu a terpenů ze stromů charakterizujících ekosystém severní polokoule popsal Isidorov⁵⁶ adsorpčně-tepelně-desorpční techniku bez kryofokusace. Při vzorkování testoval sorbenty Carboxchrom a Tenax GC, separaci analytů prováděl v kapilární kovové koloně s dinonylfталатem a k identifikaci jednotlivých sloučenin chromatografického záznamu použil MS detektor. Isidorov zjistil, že tepelná desorpce z Carboxchromu způsobuje přeměny, rozklad, izomeraci případně dehydrataci terpenů. Takto způsobené ztráty mohou být až 60 % (α - a β -pinen). Spolehlivější výsledky stanovení získal Isidorov při vzorkování na Tenax GC.

Od poloviny osmdesátých let se pro vzorkování biogenních sloučenin z ovzduší používal téměř výhradně Tenax (polymer 2,6-difenyl-*p*-fenylenoxidu). Tento sorbent se v některých případech chová nestandardně^{57,58}. V přítomnosti oxidujících látek nebo látek kyselé povahy produkuje analytické artefakty⁵⁹, reaguje s ozonem^{57,58}, jeho vlastnosti se zhoršují se zvyšujícím se počtem tepelně-desorpčních cyklů³⁰, mění se po ozáření slunečním světlem⁴³. Tyto nevýhody lze částečně eliminovat používáním tepelně kondicionovaného Tenaxu³⁰ (Tenax TA) případně jeho chemickou úpravou⁵⁹.

Pro vzorkování biogenních sloučenin z ovzduší není vhodné používat Carboxpack B (cit.⁵⁷) ani ostatní sorbenty obsahující uhlík, např. Carbotrap (cit.⁶⁰) nebo Carboxen 569, který v souvislosti se vzorkováním biogenních sloučenin v ovzduší studoval Coeur se spolupracovníky⁵⁸. Přesto se uhlíkaté sorbenty při vzorkování isoprenu v ovzduší používaly, např. v rámci projektu³⁰ BEMA (trojsložkové lože Carbotrap C/Carbotrap B/Carboxen S III) při analýze ovzduší na obsah biogenních sloučenin⁹ (Carbotrap 300). Sorbenty s obsahem uhlíku byly také použity v projektu⁶¹ BEMA, ve kterém účastníci projektu měřili denní a sezonní změny emisí monoterpenů z dubu červina (*Quercus ilex*); při květovém studiu emisí

isoprenoidů z anatomicky i morfologicky srovnatelných pěti druhů dubů (Carbosiv III a Carbotrap, Carbotrap C s Carbotrapem)⁶² i při Larsenově porovnávacím projektu⁶³.

Projekt⁶⁴ ATILA, v jehož průběhu byly v roce 1984 monitorovány isopren a terpeny v atmosféře lesních porostů ve Francii, vedl k rozšíření adsorpčně-tepelně-desorpční techniky bez kryofokusace^{52,56}. Při těchto experimentech byl použit plynový chromatograf s FID detektorem, přičemž vzorkování atmosféry probíhalo na Tenax GC a Tenax TA (cit.⁶⁵). Po adsorpci byla trubička se sorbentem připojena perforací septa dávkovače plynového chromatografu k chromatografu a adsorbované produkty byly tepelně desorbovány při 300 °C. Separace probíhala v nerezové náplňové koloně se stacionární fází Carbowax 20M.

Téměř do konce osmdesátých let vzorkování a analýza biogenních sloučenin v ovzduší probíhaly odděleně. V roce 1988 Riba⁶⁶ se spolupracovníky popsali automatizované zařízení, umožňující on-line spojení vzorkování a stanovení isoprenoidů v atmosféře. Princip jeho činnosti byl následující: biogenní sloučeniny jsou zachycovány na sorbentu (Tenax TA) naplněném v niklové trubičce, ze kterého byly po tepelné desorpci transportovány pomocí nosného plynu do kapilární kolony plynového chromatografu s plamenově ionizačním detektorem. Po tepelné desorpci analytů byl sorbent ochlazen a připraven k dalšímu vzorkování. Analýza je časově méně náročná a v porovnání s metodami používající kryofokusaci je přístroj při stejné spolehlivosti výsledků autonomnější.

Se zvyšujícím se počtem analýz na obsah biogenních sloučenin v ovzduší bylo zřejmé, že existuje korelace mezi množstvím ozonu ve vzorku analyzovaného vzduchu a analytickými artefakty. Proto v roce 1988 Jüttner⁶⁷ testoval indigokarmín, který byl v roztoku kyseliny chlorovodíkové nanesen na křemenné kuličky naplněné v ochlazené (0 °C) skleněné kapiláře a měl sloužit k odstranění ozonu. Při analýze reálných vzorků nebyl tento způsob odstraňování ozonu použit, protože v důsledku kondenzace vodní páry docházelo k zahlcování reduktoru vodou. Později Jüttner⁶⁸ použil jako reduktor ozonu komerčně vyráběný ozonový katalyzátor. Jüttner doporučuje používat tento způsob odstraňování ozonu při stanovení biogenních sloučenin v ovzduší i přesto, že katalyzátor některé terpeny (kafr, 3-karen, tricyklen, kamfen a 1,8-cineol) částečně zadržuje nebo je rozkládá. V pozdější době se k odstranění ozonu používaly: bezvodý siřičitan sodný⁶⁹, thiosíran sodný⁵⁹, jodid draselný nanesený na vnitřních stěnách anulárního denuderu⁷⁰ nebo na skleněné vatě⁷¹, případně krystalický jodid draselný⁷². K odstranění ozonu sloužila i kovová niklová trubice⁷³, uhličitán draselný⁷⁴ a oxid manganičitý nanesený na speciálně konstruované měděné síťce minimalizující ztráty biogenních sloučenin⁷⁵.

V roce 1994 dochází při analýze biogenních sloučenin v ovzduší k renezanzi kryogenního způsobu vzorkování⁴³. Kryotechnika však vyžaduje ochlazovat vzorkovaný vzduch na teploty hluboko pod bod mrazu (cca –190 °C) a je provázena kondenzací ozonu a oxidu dusičitého společně s analyzovanými látkami, což zvyšuje pravděpodobnost jejich reakcí s biogenními sloučeninami⁷¹. Peters⁴³ prokázal, že spolehlivost výsledků stanovení terpenů závisí na druhu terpenu a ovlivňují ji ozon, oxid dusičitý a relativní vlhkost vzorkovaného vzduchu.

Petersem⁴³ byly v podstatě vyčerpány instrumentální možnosti, které skýtá pro stanovení biogenních sloučenin v ovzduší plynová chromatografie. V souvislosti se stanovením iso-

prenoidů však zbývá dořešit problémy, které jsou spojeny se vzorkováním isoprenoidů z ovzduší, zejména jednoznačně definovat vliv fotooxidantů na spolehlivost stanovení isoprenoidů^{30,33,63,76}.

5. Závěr

Smyslem tohoto článku bylo seznámit čitatele se základními fakty, týkajícími se produkce a analýzy isoprenoidů v ovzduší, a s potenciálem těchto těkavých uhlovodíků ovlivňovat hladinu fotooxidantů v troposféře.

Práce byla realizována v rámci grantu 203/98/0943 GA ČR.

LITERATURA

- Kindl H., Wöber B.: *Biochemie rostlin*. Academia, Praha 1981.
- Wünsch K. H.: *Studienbucherei. Einführung in die Chemie der Naturstoffe*. VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1980.
- Timmermans J. (ed.): *Physico-Chemical Constants of Pure Organic Compounds*. Elsevier, New York 1950.
- Silver G. M., Fall R.: *Plant Physiol.* 97, 1588 (1991).
- Kuzma J., Fall R.: *Plant Physiol.* 101, 435 (1993).
- Delwiche C. F., Sharkey T. D.: *Plant Cell Environ.* 16, 587 (1993).
- Hocman G.: *Vesmír* 76, 35 (1997).
- Monson R. K., Lerdau M. T., Sharkey T. D., Schimel D. S., Fall R.: *Atmos. Environ.* 29, 2989 (1995).
- Lerdau M., Litvak M., Palmer P., Monson R.: *Tree Physiol.* 17, 563 (1997).
- Guenther A. B., Monson R. K., Fall R.: *J. Geophys. Res.* 96, 10799 (1991).
- Gildemeister E., Hoffmann F. R.: *Die aetherische öle IV*. Akademie – Verlag, Berlin 1956.
- Červinka O., Dědek V., Ferles M.: *Chemie organických sloučenin*, 2. díl, str. 476. SNTL, Alfa, Praha 1985.
- Hough A. M.: *J. Geophys. Res.* 96, 7325 (1991).
- Trainer M., Williams E. J., Parrish D. D., Buhr M. P., Allwine E. J., Westberg H. H., Fehsenfeld F. C., Liu S.: *Nature* 329, 705 (1987).
- Atkinson R., Hasegawa D., Aschmann S. M.: *Int. J. Chem. Kinet.* 22, 871 (1990).
- Atkinson R., Aschmann S. M., Pitts J. N. Jr.: *Int. J. Chem. Kinet.* 18, 287, (1986).
- Chew A. A., Atkinson R.: *J. Geophys. Res.* 101, 28649 (1996).
- Logan J., Prather M., Wofsky S., McElroy M.: *J. Geophys. Res.* 86, 7210 (1981).
- Rasmussen R. A., Went F.W.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 53, 215 (1965).
- Fehsenfeld F. C., Calvert J., Fall R., Golden P., Guenther A. B., Hewitt C. N., Lamb B., Liu S., Trainer M., Westberg H., Zimmermann P.: *Global Biogeochem. Cycles* 6, 389 (1992).
- Rasmussen R. A.: *J. Air Pollut. Control Assoc.* 22, 537 (1972).
- Zimmerman P. H., Chatfield R. B., Fishman J., Grutzen P. J., Hanst P. L.: *Geophys. Res. Lett.* 5, 679 (1978).
- Rasmussen R. A., Khalil M. A. K.: *J. Geophys. Res.* 93, 1417 (1988).

24. Guenther A., Hewitt N. C., Erickson D., Fall R., Geron C., Graedel T., Harley P., Klinger L., Lerdau M., McKay W. A., Pierce T., Scholes B., Steinbrecher R., Tallamraju R., Taylor J., Zimmerman P.: *J. Geophys. Res.* **100**, 8873 (1995).
25. Went F. W.: *Nature* **187**, 641 (1960).
26. Atkinson R.: *J. Phys. Chem. Ref. Data*, Monograph 2, 1 (1994).
27. Yu J., Cocker III D. R., Griffin R. J., Flagan R. C., Seinfeld J. H.: *J. Atmos. Chem.* **34**, 207 (1999).
28. Hanover J. W.: *J. Michigan State Univ.*, No. 5221, 625 (1972).
29. Yokouchi Y., Fujii T., Ambe Y., Fuwa K.: *J. Chromatogr.* **209**, 293 (1981).
30. Kesselmeier J., Schäfer L., Ciccioli P., Brancaleoni E., Cecinato A., Frattoni M., Foster P., Jacob V., Denis J., Fugit J. L., Dutaur L., Torres L.: *Atmos. Environ.* **30**, 1841 (1996).
31. Fuentes J. D., Wang D., Neumann H. H., Gillespie T. J., Den Hartog G., Dann T. F.: *J. Atmos. Chem.* **25**, 67 (1996).
32. Tingey D. T., Turner D. P., Weber J. A.: v knize: *Trace Gas Emissions from Plants* (Sharkey Th. D., Holland E. A., Mooney H. A., ed.), str. 93. Academic Press, San Diego 1991.
33. Steinbrecher R., Eichstädter G., Schürmann W., Torres L., Clement B., Simon V., Kotzias D., Daiber R., Van Eijk J.: *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **54**, 283 (1994).
34. Sanadze G. A., v knize: *Trace Gas Emissions from Plants* (Sharkey T. D., Holland E. A., Mooney H. A., ed.), str. 135. Academic Press, San Diego 1991.
35. Hoffmann T., Jacob P., Linscheid M., Klockow D.: *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **52**, 29 (1993).
36. Shu Y., Atkinson R.: *Int. J. Chem. Kinet.* **26**, 1193 (1994).
37. Corchnoy S. B., Atkinson R.: *Environ. Sci. Technol.* **24**, 1497 (1990).
38. Becker K. H., Brockmann K. J., Bechara J.: *Nature* **346**, 256 (1990).
39. Gäb S., Turner W. V., Kurth H. H., v knize: *Atmospheric Oxidation Processes* (Becker K. H. ed.), str. 41. Commission of the European Communities, Air Pollution Research Report 33, 1990.
40. Masuch G., Kicinski H. G., Dulme W., Kettrup A.: *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **37**, 161 (1989).
41. Macuch A., Kettrup R. K., Mallant A. M., Slanina J.: *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **27**, 183 (1986).
42. Möller D.: *Atmos. Environ.* **23**, 1625 (1989).
43. Peters R. J. B., Johannes A. D., Duivenbode V., Duyzer J. H., Verhagen H. L. M.: *Atmos. Environ.* **28**, 2413 (1994).
44. Christmann A., Frenzel B., Schiller P.: *J. Plant Physiol.* **147**, 419 (1995).
45. Prousek J.: *Chem. Listy* **89**, 11 (1995).
46. Altshuller A. P.: *Atmos. Environ.* **17**, 2131 (1983).
47. Simpson D.: *J. Geophys. Res.* **100**, 22891 (1995).
48. Whitby R. A., Coffey P. E.: *J. Geophys. Res.* **82**, 5928 (1977).
49. Hedin P. A., Thompson A. C., Gueldner R. C.: *Phytochemistry* **14**, 2088 (1975).
50. Hedin P. A.: *Environ. Entomol.* **5**, 1234 (1976).
51. Eriksson K., Levin J.-O., Rhén M., Lindal, R.: *Analyst* **119**, 85 (1994).
52. Holzer G., Shenfield H., Zlatkis A., Bertsch W., Juarez P., Mayfield H., Liebich H. M.: *J. Chromatogr.* **142**, 755 (1977).
53. Holdren M. W., Westberg H. H., Zimmermann P. R.: *J. Geophys. Res.* **84**, 5083 (1979).
54. Arnsts R. R., Petersen W. B., Seila R. L., Gray B. W. Jr.: *Atmos. Environ.* **16**, 2127 (1982).
55. Greenberg J. P., Zimmerman P. R.: *J. Geophys. Res.* **89**, 4767 (1984).
56. Isidorov V. A., Zenkevich I. G., Ioffe B. V.: *Atmos. Environ.* **19**, 1 (1985).
57. Ciccioli P., Brancaleoni E., Cecinato A., Di Palo C., Brachetti A., Liberti A.: *J. Chromatogr.* **351**, 433 (1986).
58. Coeur C., Jacob V., Denis I., Foster P.: *J. Chromatogr. A*, **786**, 185 (1997).
59. Strömvall A. M., Petersson G.: *J. Chromatogr.* **589**, 385 (1992).
60. Rothweiler H., Wagner P. A., Schlatter C.: *Atmos. Environ.* **25**, 231 (1991).
61. Bertin N., Staudt M., Hansen U., Seufert G., Ciccioli P., Foster P., Fugit J. L., Torres L.: *Atmos. Environ.* **31**, 135 (1997).
62. Steinbrecher R., Hauff K., Rabong R., Steinbrecher J.: *Atmos. Environ.* **31**, 79 (1997).
63. Larsen B., Bomboi-Mingarro T., Brancaleoni E., Calogirou A., Cecinato A., Coeur C., Chatzianestis I., Duane M., Frattoni M., Fugit J.-L., Hansen U., Jacobs V., Minnikos N., Hoffmann T., Owen S., Perez-Pastor R., Reichmann A., Seufert G., Staudt M., Steinbrecher R.: *Atmos. Environ.* **31**, 35 (1997).
64. Riba M. L., Tathy J. P., Mathieu J., Torres L.: *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **20**, 255 (1985).
65. Riba M. L., Randrianalimanana E., Mathieu J., Torres L., Namiesnik J.: *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **19**, 133 (1985).
66. Riba M. L., Tsiropoulos N., Clement B., Golfier A., Torres L.: *J. Chromatogr.* **456**, 165 (1988).
67. Jüttner F.: *Chemosphere* **17**, 309 (1988).
68. Jüttner F.: *J. Chromatogr.* **442**, 157 (1988).
69. Montzka S. A., Trainer M., Goldan P. D., Kuster W. C., Fehsenfeld F. C.: *J. Geophys. Res.* **98**, 1101 (1993).
70. Williams E. L. II., Grosjean D.: *Environ. Sci. Technol.* **24**, 811 (1990).
71. Helming D., Greenberg J.: *J. Chromatogr.* **677**, 123 (1994).
72. Helming D., Greenberg J.: *J. High Resolut. Chromatogr.* **18**, 15 (1995).
73. Riemer D. D., Milne P. J., Farmer C. T., Zika R. G.: *Chemosphere* **28**, 837 (1994).
74. Martin R. S., Westberg H., Allwine E., Ashman L., Farmer J. C., Lamb B.: *J. Atmos. Chem.* **13**, 1 (1991).
75. Hoffmann T.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* **351**, 41 (1994).
76. Fuentes J. D., Wang D., Den Hartog G., Neumann H. H., Dann T. F., Puckett K. J.: *Atmos. Environ.* **29**, 3003 (1995).

Z. Večeřa (*Institute of Analytical Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Brno*): **Isoprenoids in the Atmosphere**

The article acquaints with the basic facts on the production and analysis of isoprenoids in the atmosphere, and with the potential of the volatile hydrocarbons to influence photo-oxidant levels in the troposphere.

SACHAROSA JAKO PRŮMYSLOVÁ SUROVINA

JITKA MORAVCOVÁ

Ústav chemie přírodních látek, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6
e-mail: Jitka.Moravcova@vscht.cz

Došlo dne 25.V.2000

Klíčová slova: sacharosa, surovina, využití

Obsah

1. Úvod
2. Degradace na látky s nižším počtem uhlíků
 - 2.1. Hydrolyza, solvolýza
 - 2.2. Oxidace
 - 2.3. Úplná destrukce
3. Modifikace všech osmi hydroxylových skupin
4. Zabudování sacharosy do makromolekul
5. Neselektivní parciální modifikace
6. Selektivní parciální modifikace
7. Biotransformace na oligosacharidy
8. Závěr

1. Úvod

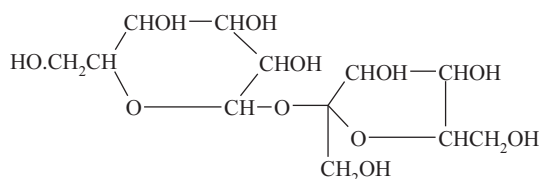
Když 17. listopadu 1747 přednášel německý chemik Andreas Sigismund Marggraf (1709–1782) před členy berlínské Královské akademie věd a krásných umění o výsledcích svých pokusů nalézt „pravý“ cukr v rostlinách rostoucích v evropských zemích, jistě netušil, jak důležitou kapitolu v historii sacharosy otevírá¹. Sám sice odhadoval, že jednoduchá výroba sirupu z řepy by mohla být pro sedláky v budoucnosti ekonomicky výhodná, ale v této době nemohla konkurovat dovozu třtinového cukru. Zásadní obrat nastal díky námořní blokáde během napoleonských válek, kdy Francie trádala velkým nedostatkem cukru. Jakmile Napoleon uslyšel o otevření prvního cukrovaru (někdy kolem 1806–1807), přispěchal s celým dvorem a dekoroval majitele cukrovaru řádem Čestné legie, který strhnul z vlastní hrudi². Po bitvě u Waterloo začaly prakticky všechny evropské země zpracovávat řepu cukrovou k velké škodě anglických kolonií a ve druhé polovině 19. století už množství cukru vyrobeného z řepy začalo konkurovat cukru třtinovému; v kampani 1994/95 bylo 30 % veškerého cukru vyrobeno z cukrovky.

Sacharosa je vůdčí komoditou po století, a proto nepřekvapuje, že snaha o zjištění její konstituce sahá až do pravěku organické chemie. První spalovací analýzu provedl³ Prout v roce 1827 a na jejím základě odvodili nezávisle Liebig, Peligot, Berzelius a Dubrunfaut správný sumární vzorec $C_{12}H_{22}O_{11}$. Tollens v roce 1883 navrhl pro sacharosu strukturu glukoseptanosylfruktofuranosidu a o 10 let později odvodil Fischer, že

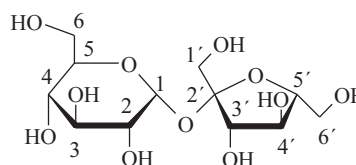
sacharosa je glukofuranosylfruktofuranosa. Až po roce 1926 na základě klasické methylační analýzy Haworth^{4,5} postupně navrhl několik dalších strukturních vzorců, z nichž ten z roku 1929 (obr. 1) je považován za první Haworthovu perspektivní projekci. Sacharosa (β -D-fruktofuranosyl- α -D-glukopyranosid) (obr. 2) je neredukující disacharid, který obsahuje osm hydroxylových skupin. Tři primární hydroxylové skupiny jsou reaktivnější (v pořadí $6 \sim 6' > 1'$) při alkylicích a acylicích než zbývajících pět sekundárních hydroxylových skupin. S čídellem, které je schopno reagovat se všemi hydroxylovými skupinami, by mohla sacharosa teoreticky poskytnout směs až 255 derivátů se stupněm substituce 1–8.

Sacharosa se světovou roční produkcí vyšší než 115 milionů tun je nejdostupnější organickou sloučeninou se 100% čistotou, s nízkou molekulovou hmotností a nízkou cenou, přesto se jí pro jiné účely než ryze potravinářské používá jen zhruba 5 % produkce. Její fyzikálně-chemické vlastnosti jsou totiž pro další modifikace jak výhodné (je krystalická, není hygroskopická, je chirální a enantiomerně čistá, je z obnovitelných zdrojů a biodegradabilní), tak nevýhodné (vysoká polarita, je polyfunkční a ze všech disacharidů nejlabilnější v kyselém prostředí). Právě zřejmé výhody sacharosy podnítily obrovský zájem chemiků o její využití jako průmyslové suroviny. Zatímco v období do roku 1965 bylo publikováno jen 15 plně identifikovaných derivátů sacharosy, v současné době je popsáno více než 300 těchto sloučenin⁶, což je přičítáno zájmu vyvolanému ropnou krizí v letech sedmdesátých. Rovněž velký počet přehledných článků a monografií výstižně charakterizuje základní orientaci výzkumu sacharosy za posledních 10 let (cit.^{6–22}).

Nízká cena vstupní suroviny je nutnou ale nikoliv postačující podmínkou pro technologické uplatnění. Jestliže se uvažuje o tom, jaké průmyslové využití sacharosy jako unikátní chemikálie může mít reálnou naději na komerční úspěch, je nutno zvažovat i další kritéria související s vlastnostmi produktů a meziproduktů ze sacharosy a s dostupností technologií. Lze je formulovat například do následujících obecných zásad: i) produkty musejí mít lepší aplikační nebo ekologické



Obr. 1. Strukturní vzorec sacharosy



Obr. 2. β -D-Fruktofuranosyl- α -D-glukopyranosid

vlastnosti, a nebo musejí být levnější než ty původní, *ii*) meziprodukty by měly být zpracovatelné běžnou průmyslovou chemií (např. polymerizací), *iii*) technologie by měly zahrnovat minimum reakčních kroků s využitím levných činidel za environmentálně bezpečných podmínek, *iv*) reakce by měly probíhat buď ve vodném roztoku nebo bez rozpouštědla, *v*) v žádném stupni nelze použít kyselé prostředí nebo kyselé katalyzátory, *vi*) izolace a separace produktů musí být co nejjednodušší a snadno převoditelná z laboratorního do výrobního měřítka.

Tento článek si klade za cíl podat souhrnnou nikoliv však vyčerpávající informaci o možnostech průmyslového využití sacharosy a o současném směru základního výzkumu v této oblasti.

2. Degradace na látky s nižším počtem uhlíků

2.1. Hydrolýza, solvolýza

Zpracování sacharosy na invertní cukr (ekvimolární směs D-glukosy a D-fruktosy) patří mezi historické technologie. Hydrolýza může být katalyzovaná minerálními kyselinami²³,

silně kyselým iontoměničem^{24,25} nebo enzymaticky. Právě posledním jmenovaný postup využívající invertasu²⁶ (β -fruktofuranosidasa) z různých zdrojů (droždí^{19,27}, *Sacharomyces*^{28–30}, syrovátka³¹, gepy³²) byl považován za velice perspektivní, ale stále ještě je ekonomicky méně výhodný než hydrolyza chemická. Podmínkou rentability¹⁹ je totiž konverze vyšší než 70 % při koncentraci sacharosy cca 1 kg.l⁻¹. Bohužel aktivita invertasy klesá s rostoucí koncentrací sacharosy již od 0,4 mol.l⁻¹ jako důsledek silných intra- a intermolekulárních vodíkových vazeb, které způsobují asociaci molekul substrátu do struktur pro účinek enzymu nevýhodných. Invertní cukr lze dokonce získat i hydrolyzou sacharosy bez přidání kyselého katalyzátoru, kdy jako interní katalyzátor působí kyseliny vzniklé oxidací sacharosy přímo v reakční směsi³³. Chemická hydrolyza je doprovázena tvorbou vedlejších produktů, dianhydridů difruktosy³⁴. Perspektiva výroby invertního cukru je do značné míry také ovlivněna ekonomikou jeho dalšího využití. V současné době je hlavní surovinou pro výrobu mannitolu. Katalytickou redukcí se získá směs 2:1 D-glucitolu (sorbitol) a mannitolu, ze kterého mannitol krystaluje a používá se pro výrobu sladidel³⁵; v Německu je touto cestou zpracováváno³⁶ ročně asi 150 000 tun. Dále slouží k získání L-sorbose pro výrobu vitamínu C mikrobiální oxidací³⁷ pomocí *Zymomonas*

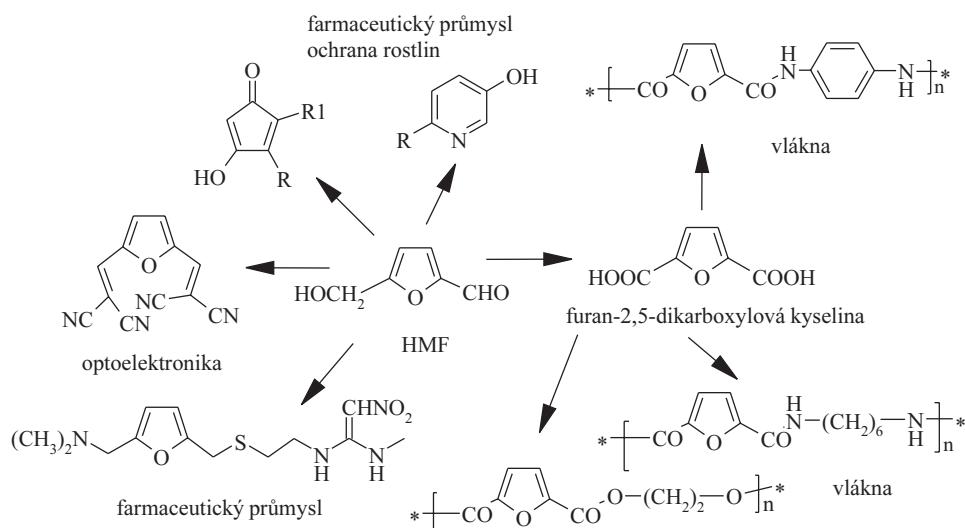


Schéma 1

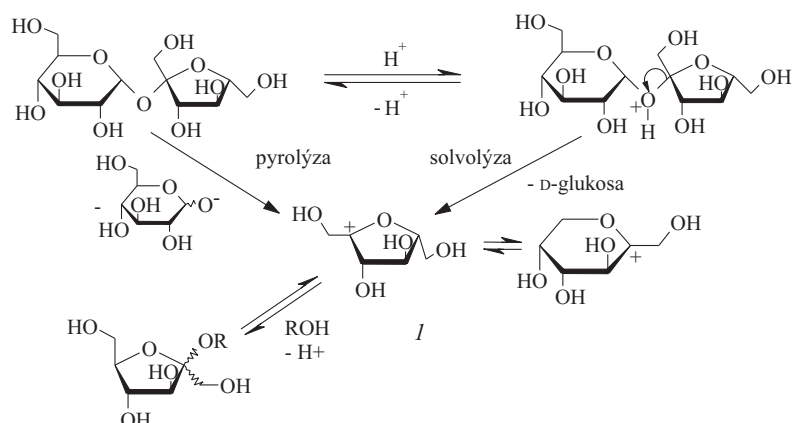


Schéma 2

mobilis a *Gluconobacter suboxydans*. Konečně lze invertní cukr fermentovat na směs D-glucitolu a D-glukonanu sodného³⁸. Pokud je invertní cukr surovinou pro výrobu čisté D-fruktosy a D-glukosy³⁹, je nezbytné zařadit pro separaci obou monosacharidů z matečných louhů po odkrystalování části D-glukosy chromatografii na iontoměničích^{40–42}. Tento krok celý proces poněkud znevýhodňuje oproti výrobě D-glukosy a D-fruktosy z jejich alternativních surovin jakými je škrob a celulósa nebo fruktany. Aby se zvýšila účinnost separace směsi D-glukosy a D-fruktosy, je možné převést v první řadě D-glukosu na jinou využitelnou a současně lépe separovatelnou sloučeninu. Výhodné je katalyticky na paladiu oxidovat D-glukosu na D-glukonovou kyselinu vzduchem⁴³, možné je to i enzymaticky^{44–46} nebo elektrochemicky⁴⁷ či chemicky. Další možností je oxidativní dekarboxylace na D-arabinonovou kyselinu, která po hydrogenaci poskytne D-arabinitol⁴⁸. Výroba D-glukosy a D-fruktosy začne být pravděpodobně ještě zajímavější, nalezne-li alespoň jedna z obou hexos nějaké další nové a významné odbytí; lepší vyhlídka je z tohoto pohledu přisuzována D-fruktoze, která je perspektivní jako surovina pro výrobu 5-hydroxymethylfurfuralu (HMF). Tato sloučenina je produktem degradace všech hexulos v kyselém prostředí a Südzucker (SRN) má patentovanou jeho výrobu z D-fruktosy⁴⁹, ve které se výtěžek krystalického HMF pohybuje mírně nad 40 % po chromatografické separaci na iontoměničích.

HMF vzniká také z D-glukosy za drastičtějších podmínek za zvýšeného tlaku⁵⁰, vedlejšími produkty jsou D-fruktosa a D-mannosa. HMF je sloučenina s velmi širokým uplatněním, která by mohla ve výrobě velkotonážních chemikálií nahradit⁹ suroviny založené na petrochemii (schéma 1); typickým příkladem je náhrada kyseliny tereftalové za furan-2,5-dikarboxylovou kyselinu při výrobě polyamidů.

Solvolýza sacharosy (schéma 2) probíhá přes reaktivní intermediát, D-fruktofuranosylkarboniový kation *1*, který vzniká i pyrolýzou sacharosy⁵¹ a který může dále reagovat za vzniku oligosacharidů, polysacharidů nebo reakcí s nejrůznějšími alkoholy poskytovat glykosidy použitelné jako detergenty⁵². Výběr vhodných alkoholů je prakticky neomezený a je možné, že alkylglykosidy připravené z vyšších alkoholů by se mohly uplatnit jako nová skupina detergentů vedle už vyráběných alkylpolyglykosidů⁵³. Ke stejnému účelu by mohla sloužit solvolýza fluorovodíkem, který podporuje tvorbu tohoto oxokarboniového kationtu *1* a narozdíl od jiných minerálních kyselin v něm nedochází k nežádoucí dehydrataci sacharidů až na deriváty furanu. Tímto způsobem lze zatím ekonomicky vyrábět alkylglukosidy z D-glukosy, celulósy nebo škrobu⁵⁴. Reakce sacharosy s fluorovodíkem za mírných podmínek poskytuje⁵⁵ snadno dianhydridy *2* a *3* (schéma 3), které nabízejí další možnosti transformací sacharosy na nízkokalorické přísady do potravin nebo na výrobu polymerů.

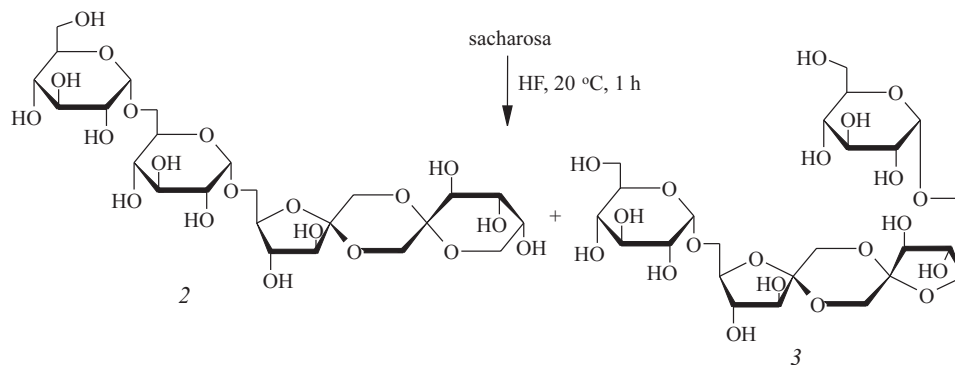


Schéma 3

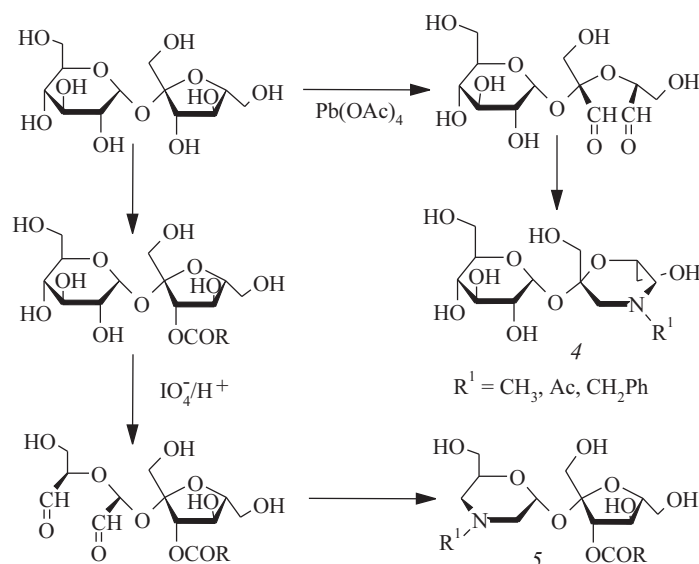


Schéma 4

2.2. Oxidace

Oxidační činidla klasicky používaná v chemii sacharidů – octan olovičitý a kyselina jodistá – selektivně štěpí⁵⁶ fruktofuranosový a glukopyranosový kruh v molekule sacharosy (schéma 4). Vzniklé dialdehydy lze podrobit reaktivní aminaci za vzniku derivátů morfolinu 4 a 5, z nichž některé jsou sladké a mohly by nalézt uplatnění i v syntéze biologicky aktivních látek. Pokud se k oxidaci použije sacharosa chráněná v polohách 6 a 6', pak obě činidla oxidují oba dva cukerné kruhy na příslušný tetraaldehyd, který redukcí a hydrolýzou poskytne enantiomerně čisté 3-substituované deriváty D-glycerolu⁵⁷. Selektivní oxidace primárních hydroxylových skupin sacharosy na skupiny karboxylové kyslíkem na platině nebo paladiu probíhá zejména na uhlíku C-6 a C-6' za vzniku směsi 6,6'-dikarboxylové a 6- i 6'-monokarboxylových kyselin. Za drastičtějších podmínek⁵⁸ se oxiduje i třetí primární hydroxylová skupina v poloze 1' a vzniklá 6, 1', 6'-trikarboxylová kyselina je používána do pracích prášků proti usazování vodního kamene.

2.3. Úplná destrukce

Hydrogenolýza sacharosy za vysokých tlaků a teplot vede ke směsi ethylenglykolu, glycerolu a propan-1,2-diolu, která byla za II. světové války prodávána jako nemrzoucí směs pro bojovou techniku. Racemická kyselina mléčná vzniká energeticky oxidací sacharosy ve vysokém výtěžku a i ona představuje perspektivní surovinu z obnovitelných zdrojů pro další průmyslové využití. Alternativní postup výroby L-mléčné kyseliny využívá fermentaci sacharosy ale i D-glukosy nebo melasy pomocí plísní *Rhizopus arrhizus* nebo *R. oryzae*^{59–61}. Pyrolýza O-acetylderivátu methylesteru kyseliny mléčné poskytuje totiž methylakrylát⁶², důležitý monomer pro výrobu umělých hmot. Dále kyselina mléčná celkem ochotně podléhá^{63–65} polykondenzaci na polymer, který je biodegradabilní a vhodný zejména pro výrobu obalů⁶⁶ a pro výrobu léků s postupným, dlouhodobým účinkem^{67,68}. Polymer L-mléčné kyseliny složený ze 3–19 jednotek má kancerostatický účinek při rakovině tlustého střeva a prsů⁶⁹. Jednou z nejvíce sledovaných přeměn sacharosy je její fermentace na ethanol pomocí

bakterií *Zymomonas mobilis*, *Escherichia coli* nebo *Klebsiella oxytoca*⁷⁰. Průmyslovému využití zatím brání nízká konverze (<70 %) díky tvorbě vedlejších produktů a energeticky náročná izolace ethanolu ze zředěného roztoku s koncentrací max 70 g.l⁻¹. Pouhá změna experimentálních podmínek se zdá být nedostatečná, a proto se velké naděje vkládají do genového inženýrství⁷⁰. Dále se studuje⁷¹ např. degradace sacharosy na kyselinu šťavelovou pomocí *Aspergillus niger*. Výtěžky jsou bohužel dost nízké (0,3 kg.l⁻¹ kg sacharosy), protože extracelulární enzymy hydrolýzují sacharosu a D-glukosa je pak oxidována na D-glukonovou kyselinu. Více než 60 let je intenzivně studována výroba methanolu, glycerolu a glykolů hydrokrykáním sacharidů nejnověji s použitím katalyzátorů na bázi tranzitních kovů⁷². Originální myšlenka na využití sacharosy na výrobu syntetického plynu (CO + H₂), jehož další konverze na širokou paletu chemikálií a paliv je dostatečně prozkoušena, je prozatím v počátečním stadiu. Podobně enzymová konverze sacharosy na vodík už není nereálná alespoň v laboratorním měřítku, dosažená produkce byla 1,34 mol H₂ na 1 mol sacharosy⁷³. Nicméně náhrada fosilních paliv obnovitelnými zdroji energie patří mezi technologie budoucnosti.

3. Modifikace všech osmi hydroxylových skupin

V této skupině derivátů jednoznačně první místo náleží esterům sacharosy. Oktaacetát sacharosy je hořký a přidává se do nápojů⁶², hlinitá sůl oktasulfátu sacharosy je populární lék proti žaludečním vředům (Sucralfatum, Anthepsin, Ulcermin, Ulsanic)⁷⁴. Směsný ester diacetát-hexaisobutyrtát sacharosy (SAIB) je v některých zemích přidáván do nápojů jako plnidlo⁷⁵. Oktamethylsacharosa a karboxymethylsacharosa slouží k výrobě filtračních medií⁶².

4. Zabudování sacharosy do makromolekul

Již samotná příprava monomeru je komplikována nejednotností produktu, proto se většinou vede tak, aby vznikla směs asi 50 % monomeru vedle nezreagované sacharosy, a po

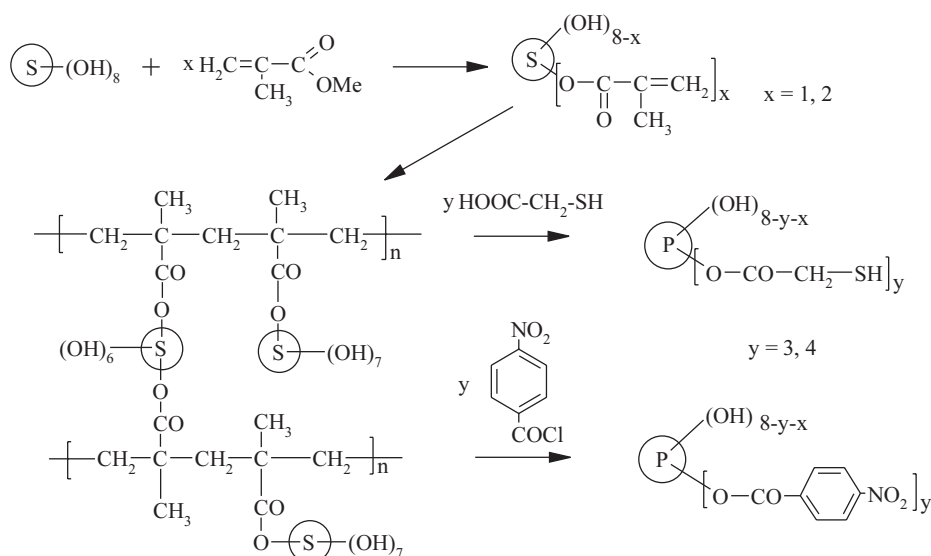
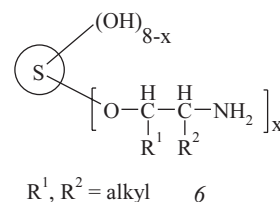


Schéma 5

radikálové polymerizaci se sacharosa odstraní extrakcí¹⁰. Tak se připravují hydrofilní zesíťované gely na bázi akrylátu nebo methakrylátu sacharosy, které se po vhodné derivatizaci používají k chelataci kovů (schéma 5). Zavedení *p*-nitrobenzoylové skupiny dovozuje ušít chelatační činidlo na míru následnou transformací nitro skupiny přes amino na diazoniovou skupinu, která snadno podléhá nukleofilním substitucím. Z methakrylátů sacharosy byly rovněž připraveny účinné katalyzátory fázového přenosu a fotolýzy vody¹⁰. Průmyslově by se mohly vyrábět polyurethany (schéma 6), které jsou vhodné díky nižší hořlavosti zejména na autosedačky⁷⁶. Před polymerizací je sacharosa alkylována ethylenoxidem nebo propylenoxidem, protože urethany vyrobené ze sacharosy samotné jsou křehké. Rozsáhlá patentová ochrana výše zmíněných polymerů i dalších dokládá současnou renesanci využití sacharosy na biodegradabilní polymery; nicméně se doposud žádný z nich průmyslově nevyrábí.

5. Neselektivní parciální modifikace

Monoestery sacharosy s kyselinou stearovou, laurovou, behenovou, olejovou, palmitovou nebo myristovou se již od roku 1959 používají jako neionogenní detergenty v potravinách a kosmetice. Obsahují obvykle 70 % monoesteru, 30 % diesteru a zbytek je tvořen tri- a polyestery. Vyrábějí se transesterifikací a to buď triacylglycerolu v dimethylsulfoxidu nebo methylesterů mastných kyselin bezrozpouštědlovou technologií⁷⁷. Monoestery sacharosy dispergované ve vodě (Semperfresh®), produkt firmy Semperviva (VB), vytvářejí na povrchu ovoce či zeleniny polopropustnou membránu zpomalující zrání, a proto se uplatňují i jako obalový materiál. Aminoalkylethery sacharosy 6 tvoří základ dvou nových perspektivních skupin neionogenních detergentů: i) amidy získa-



né reakcí aminu 6 s chloridy mastných kyselin a ii) deriváty močoviny získávané reakcí látky 6 s alifatickými isokyanáty. Ve srovnání s běžnými estery sacharosy mají vyšší hydrolytickou stabilitu. Polyfunkční deriváty sacharosy s amidickými skupinami se těší pozornosti jako kondenzační komponenty pro přípravu formaldehydových pryskyřic⁷⁸ (schéma 7). Tvorba esterů biologicky aktivních látek se sacharosou nebo D-glukosou zvýší jejich rozpustnost ve vodě až 400x, čehož se využívá v humánní i veterinární medicíně a v ochraně rostlin. V případě sacharosy nemá stupeň esterifikace přesáhnout 2, pak rozpustnost rapidně klesá¹⁰. Směs esterů sacharosy s kyselinou olejovou se stupněm esterifikace 6 až 8 byla vyvinuta firmou Procter&Gamble jako nekalorická náhrada tuků pod názvem Olestra a po 9 letech výzkumu byla v roce 1997 povolena pro použití v potravinách. Vyrábí se bezrozpouštědlovou transesterifikací a ve druhém stupni jsou mono- až pentaestery odstraněny enzymovou hydrolyzou lipasami. Olestra má tu výhodu, že není organismem metabolizována, na druhou stranu je nutno dodávat vitamíny rozpustné v tucích, které mohou být z těla vyplavovány.

6. Selektivní parciální modifikace

4,1',6'-Trichlor-4,1',6'-trideoxy-galakto-sacharosa (sukralosa), intenzivní sladidlo vyvinuté firmami Tate&Lyle a John-

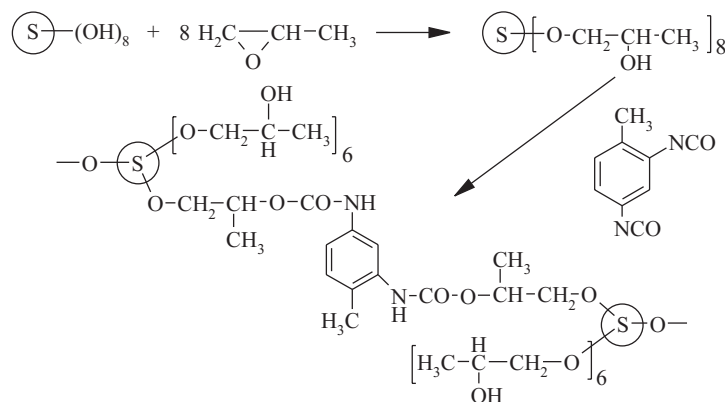


Schéma 6

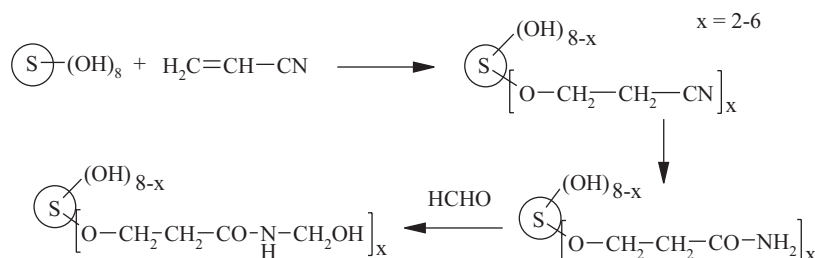


Schéma 7

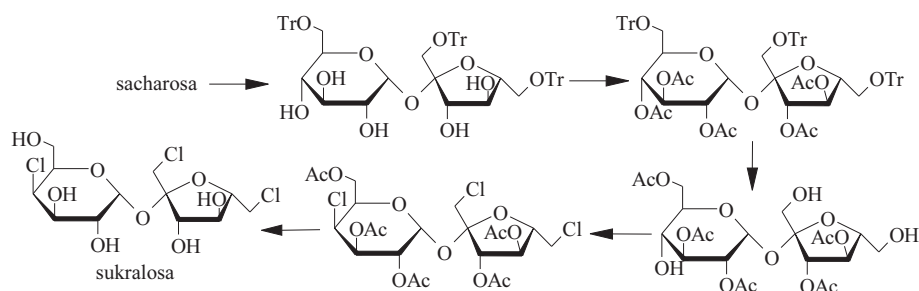


Schéma 8

son&Johnson, je asi 650× sladší než sacharosa a může sloužit jako důkaz, že v průmyslovém měřítku je možno realizovat i složitou technologii na polyfunkční surovině, pokud lze očekávat výrazný finanční úspěch. Impuls k zavedení sukralosy do výroby dal obchodní úspěch aspartamu, jehož produkce skočila z 11 milionů dolarů v roce 1981 na 700 milionů v roce 1985. Podle původního postupu^{79,80} (schéma 8) byla sacharosa nejprve tritylována na primárních hydroxylových skupinách a poté acetylována. Při odstraňování chránících tritylových skupin současně migruje acetyl z polohy 4 do polohy 6 a vzniklý 2,3,6,3',4'-pentaacetát je substituován chlorem v polohách 4, 1' a 6'. Celý postup by bylo možno zkrátit selektivním chráněním primární hydroxylové skupiny v poloze 6. Řešením je současný výrobní postup^{81,82} využívající třístupňovou cestu přes diacetal sacharosy 7, který kontrolovanou acetolýzou poskytne 6-*O*-acetát 8 a ten je již přímo chlorován Vilsmeierovým činidlem (schéma 9). Za tímto účelem byla rovněž studována příprava 6-*O*-acetylsacharosy tak, že D-glukosa byla nejprve fermentována s *Bacillus megaterium* na 6-*O*-acetyl-D-glukosu a ta byla glykosylována D-fruktosou pomocí nového kmene *B. subtilis*⁸³. Maximální dosažená koncentrace 6-*O*-acetylsacharosy byla 120 g.l⁻¹, což odpovídá výtěžku 58 %.

Pokud sacharosa má být skutečnou průmyslovou surovinou, je třeba nalézt jednoduché a do velkého měřítko snadno převoditelné selektivní reakční cesty od sacharosy k meziproduktům, které mohou být dále zpracovávány arsenálem organické chemie. Pravděpodobně největší perspektivu nabízí zavedení aktivované dvojné vazby např. oxidací některé sekundární hydroxylové skupiny. Tak přístup k derivátům sacharosy modifikovaným v poloze 2 otevírá 2-*O*-benzylsacharosa 9, kterou lze získat přímou benzylací v silně alkalickém prostředí⁸⁴ (schéma 10). Reakce se ukončí při 50% konverzi, protože pak je izolace benzyletheru 9 od nezreagované sacharosy jednoduchá. Dále je výhodné⁸⁵ ether 9 acetylovat a podrobit

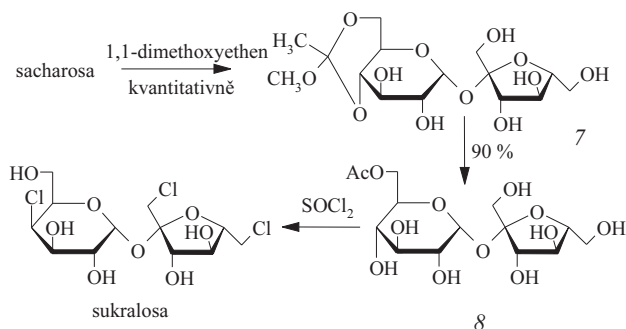


Schéma 9

hydrogenolýze na krystalický hepta-*O*-acetylderivát 10, jehož celkový výtěžek je 21 %, počítá-li se na skutečně zreagovanou sacharosou, tak 40 %. Podobně lze připravit i hepta-*O*-benzylderivát 11, který se snadno oxiduje na odpovídající 2-ketosacharosa 12. V mírně alkalickém prostředí se kvantitativně eliminuje kyselina benzoová a vznikne fruktosylovaný dihydropyranon 13 v celkovém výtěžku 14 % na sacharosou. Krystalická hepta-*O*-pivaloylsacharosa 14 zase představuje⁸⁵ vstup k derivátům sacharosy v poloze 4 (schéma 11). Lehce může být oxidována⁸⁶ na 4-ketosacharosa 15, která v silně alkalickém prostředí eliminuje⁸⁵ kyselinu pivalovou na dihydropyranon 16, který se získá s celkovým výtěžkem na sacharosou kolem 40 %. Nízký počet reakčních kroků, příznivé celkové výtěžky a relativně jednoduché čistící operace činí z dihydropyranonů 13 a 16 perspektivní chirální stavební bloky pro průmyslové aplikace.

Až do roku 1974 nebyl znám žádný cyklický acetal sacharosy, přestože tento způsob chránění hydroxylových skupin cukrů je možno označit za klasický. Možnost modifikovat

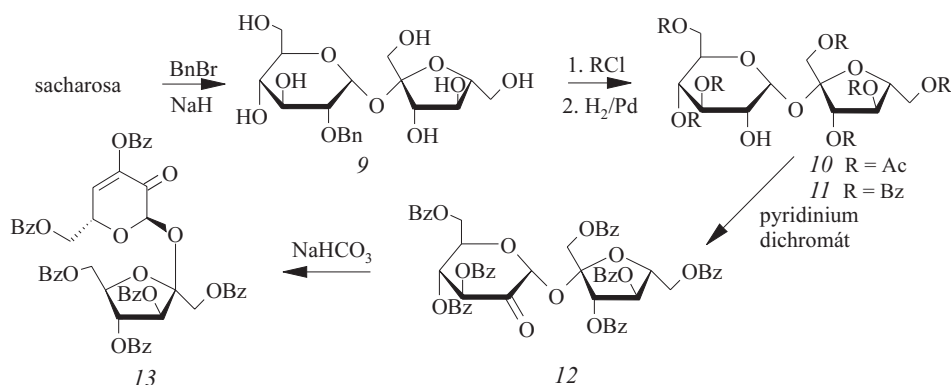


Schéma 10

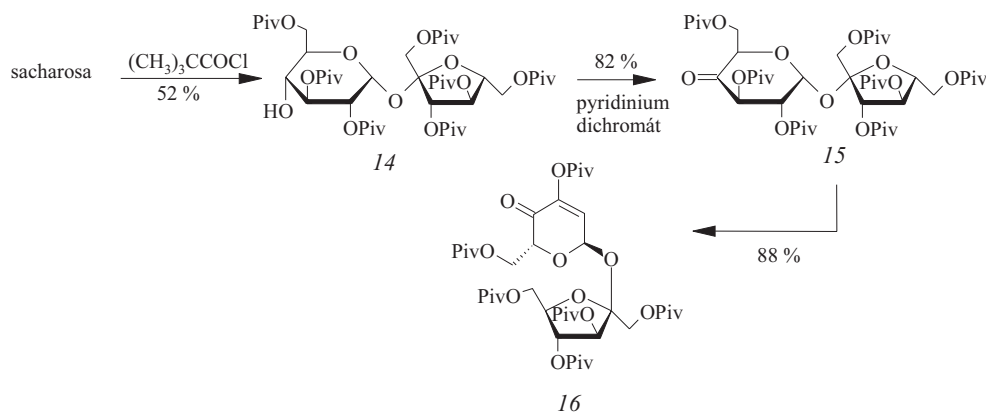


Schéma 11

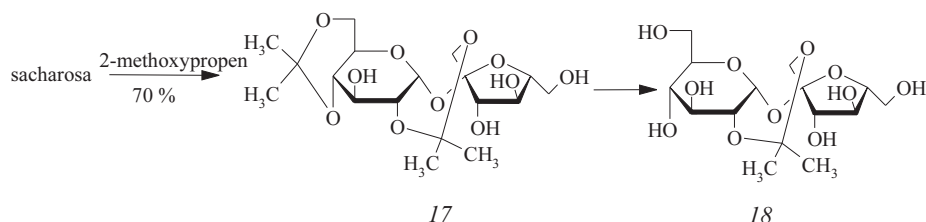


Schéma 12

sacharosu v poloze 2 a/nebo 1', resp. v polohách 3,4,6,3',4' a 6', nabízí diisopropylderivát 17, který lze kontrolovanou hydrolyzou převést na 2,1'-diisopropylderivát 18 ve vysokém výtěžku⁸⁷ (schéma 12).

K parciálnímu modifikacím sacharosy si rychle našly cestu i biokatalyzátory, které mají řadu nepřehlédnutelných výhod: biotransformace probíhají obvykle za mírných podmínek (vodné prostředí, neutrální pH, normální teplota), jsou regio- a stereoselektivní a izolace produktů je snadnější. Velké úsilí bylo a stále je upřeno na využití enzymů jako jsou esterasy nebo lipasy pro přípravu parciálních derivátů sacharosy, ale v tomto případě je selektivita enzymových reakcí často paralelní k selektivitě reakcí chemických, jak ilustruje⁸⁸ příprava 6-*O*- a 6'-*O*-acylderivátů sacharosy ve výtěžcích 20–27 %. Jednou z nejvíce studovaných reakcí je oxidace sacharosy pomocí *Agrobacterium tumefaciens*, která vede⁸⁹ ke 3-ketosacharose (19) a vhodně tak zapadá do koncepce naznačené výše. Aby byla taková reakce ekonomicky výhodná ve velkovýrobě, musí¹⁷ být koncentrace sacharosy v médiu nejméně 10–12 %. Bohužel výtěžek oxidace silně závisí na koncentraci sacharosy⁸⁹ (60 % pro 5 g.l⁻¹ a 40 % pro 20 g.l⁻¹), proto nelze zatím reálně uvažovat o průmyslové využití. Nicméně některé další reakce 3-ketosacharosy jsou zajímavé; rozkladem v alkalickém prostředí vzniká eliminací endiol 20, který se izoluje jako acétát nebo benzoát v celkovém výtěžku až 30 % na sacharosu (schéma 13) a představuje další typ chirálního synthonu odvozeného od dihydropyranonu.

7. Biotransformace na oligosacharidy

Největší pole působnosti zatím našly biotechnologie ve výrobě oligosacharidů, kdy sacharosa může být jak donorem D-glukosy nebo D-fruktosy, tak jejich akceptorem. Leukrosa (5-*O*-(α -D-glukopyranosyl)- β -D-fruktopyranosa) se vyrábí fermentací 65 % roztoku obsahujícího 1/3 sacharosy a 2/3 fruk-

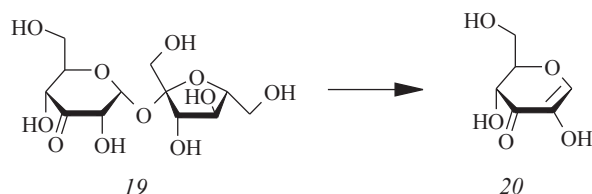


Schéma 13

tosy pomocí dextransacharosy produkované bakterií *Leuconostoc mesenteroides*⁹⁰. Výtěžek je na hranici 90 % a posledním krokem je separace leukrosy od fruktosy na ionoměničích. Produkce leukrosy v roce 1989 byla 10 t (Pfeifer&Langen, SRN). Protože má leukrosa jen asi 50 % sladivosti sacharosy a je dražší, není jako sladidlo příliš perspektivní, i když není kariogenní. Ovšem potenciál jejího dalšího chemického zpracování není zdaleka vyčerpán. Glykosidická vazba $\alpha(1 \rightarrow 5)$ je hydrolyticky stabilnější a leukrosa má jen dvě primární hydroxylové skupiny, což ji proti sacharose zvyhodňuje.

Velkým úspěchem biotechnologií je výroba isomaltulose (palatinosa, 6-*O*-(α -D-glukopyranosyl)- β -D-fruktofuranosa), která dosáhla 20 000 t v roce 1991 (Südzucker). Na izomerizaci se používají^{91,92} imobilizované buňky bakterií *Protaminobacter rubrum*, isomaltulosa se izoluje ve výtěžku asi 80 % krystalizací a vedlejším produktem ve výtěžku ca 10 % je trehalulosa (1-*O*-(α -D-glukopyranosyl)- β -D-fruktopyranosa). Isomaltulosa má asi 42 % sladivosti sacharosy, ale sama se jako sladidlo nepoužívá, nýbrž se katalyticky hydrogenuje na směs 6-*O*- α -D-glukopyranosyl-D-glucitolu a 1-*O*- α -D-glukopyranosylmannitolu, která je nízkokalorickým sladidlem s obchodním názvem Isomalt (palatinitol). Není kariogenní a je vhodný pro diabetiky. I isomaltulosa má před sebou velkou perspektivu jako průmyslová surovina. V jednom kroku ji lze převést⁹³ na α -glukosyloxymethylfurfural ve výtěžku kolem 70 %, který by mohl být další velkotonážní chemikálií, neboť na něm lze provádět řadu reakcí bez chránění cukerné části.

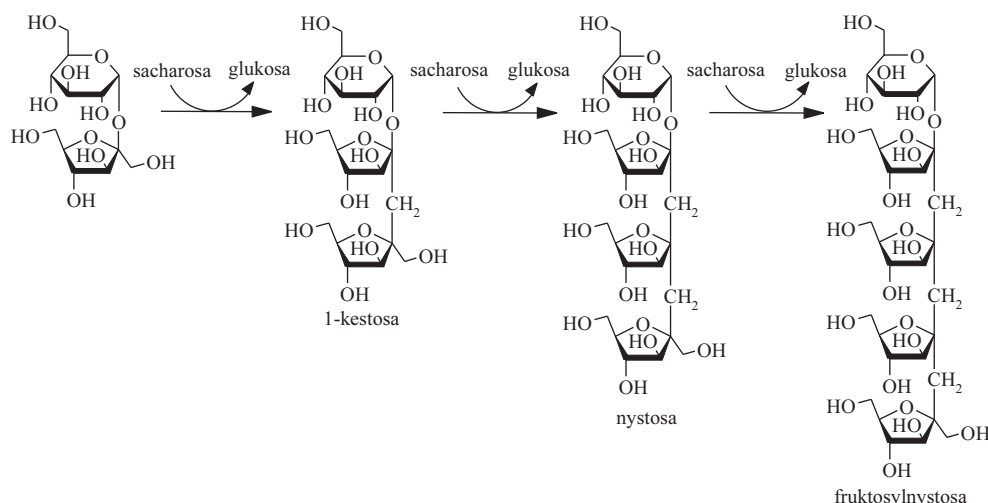


Schéma 14

Za zmínku stojí i snadná oxidace⁹⁴ isomaltulose vzduchem v alkalickém prostředí na glukosyl- α -(1 $\rightarrow$ 5)-arabinonát s výtěžkem 80–90 %. Jak leukrosa tak isomaltulosa jsou oxidovány¹⁷ pomocí *Agrobacterium tumefaciens* v poloze 3 glukosové části molekuly a to v daleko vyšším výtěžku než sacharosa, což je jejich další výhoda.

Pro transglukosylace se sacharosou jako donorem lze použít různé mikroorganismy i různé akceptory (maltosa, cellobiosa aj.) a produktem jsou lineární dextrany, které mohou být surovinou pro výrobu iontoměníčů nebo komplexačních činidel.

Řada mikroorganismů (*B. subtilis*, *Aerobacter levanicum*, *Streptococcus salivarius*, *Zymomonas mobilis*, *B. polymyxa*) produkuje fruktosyltransferasy, které přenášejí fruktosovou část sacharosy na sacharosu jako akceptor, přičemž odpadá glukosa jako vedlejší produkt. Průmyslově se vyrábí⁹⁵ směs fruktooligosacharidů pod obchodním názvem Actilight (dříve Neosugar, Meiji Seiko Comp., Japonsko) a používá se jako sladidlo (nerozkládá se v žaludku, ale fermentuje se střevními bakteriemi a podporuje tak růst bifidobakterií). Vstupní surovinou je 60% roztok sacharosy, který je fermentován s buňkami *Aureobasidium pullulans* var. *melanigenum* nebo *Aspergillus niger* a výrobí se produkt s obsahem 1-kestosy a nystosy kolem 25 %, D-glukosa tvoří 27 %, sacharosa 13 % a zbytek jsou vyšší oligomery (schéma 14). Actilight se oddělí od glukosy a vyšších oligomerů chromatografií na ionexech.

8. Závěr

Přes nemalé finanční prostředky a úsilí řady vědců investované do využití sacharosy jako suroviny pro velkotonážní výroby nelze říci, že by bylo dosaženo zásadního obratu situace. Nicméně se zdá, že trend zaměřený na náhradu fosilních surovin tak, aby byly ze sacharosy získány např. polymery s identickými užitnými vlastnostmi, pomalu ustupuje do pozadí. V současnosti se spíše hledají nové produkty s novými užitnými vlastnostmi, ve kterých by sacharosa vystupovala jako unikátní surovina. Ekonomiku výroby může pozitivně ovlivnit i to, že jako vstupní surovina může figurovat i některý cukrovarnický meziprodukt jako je např. surový cukr.

Seznam zkratk

Ac	acetyl
Bn	benzyl
Bz	benzoyl
Ph	fenyl
Piv	2,2-dimethylpropionyl (pivaloyl)
Tr	trifenylmethyl (trityl)

Tato práce je součástí řešení výzkumného záměru MŠMT č. 223300005.

LITERATURA

1. Bruhns G.: Zuckerindustrie 122, 771 (1997).
2. Aykroyd W. R., v knize: *Sugars in Nutrition* (Sipple H. L., McNutt K. W., ed.), str. 6. Academic Press, New York 1974.
3. Prout W.: Phil. Trans. 1, 355 (1827).
4. Charlton W., Haworth W. N., Peat S.: J. Chem. Soc. 1926, 89.
5. Haworth W. N., Hirst E. L.: J. Chem. Soc. 1926, 1858.
6. Khan R.: Int. Sugar J. 96, 12 (1994).
7. Khan R., Jones H. F.: Sugar Ser. 9, 367 (1988).
8. James C E., Hough L., Khan R.: Prog. Chem. Org. Nat. Prod. 55, 117 (1989).
9. Schiwech H., Numir M., Rapp K. M., Schneider B., Vogel M.: Zuckerindustrie 115, 555 (1990).
10. Gruber H., Greber G.: Zuckerindustrie 115, 476 (1990).
11. Mantovani G., Vaccari G.: Ind. Sacc. Ital. 83, 139 (1990).
12. Dobrzycki J.: Gaz. Cukrov. 99, 81 (1991).
13. Lichtenthaler F. W.: *Carbohydrates as Organic Raw Materials*. VCH, Weinheim 1991.
14. deWit D., Maat L., Kieboom A. P. G.: Ind. Crops Prod. 2, 1 (1993).
15. Descotes E.: *Carbohydrates as Organic Raw Materials II*. VCH, Weinheim 1993.
16. Khan R.: Sucrose 1995, 264.
17. Buchholz K.: Zuckerindustrie 120, 692 (1995).
18. Mathlouthi M., Reiser P.: *Sucrose: Properties and Applications*. Blackie & Professional, London 1995.
19. Monsan P.: Zuckerindustrie 120, 705 (1995).

20. Van Bekkum H., Roeper H., Voragen F.: *Carbohydrates as Organic Raw Materials III*. VCH, Weinheim 1996.
21. Jarosz S.: Pol. J. Chem. 70, 972 (1996).
22. Lichtenthaler F. W., Mondel S.: Pure Appl. Chem. 69, 1853 (1997).
23. Moiseev Yu. V., Khalturinskij N. A., Zaikov G. E.: Carbohydr. Res. 51, 23 (1976).
24. Asakawa T., Asano S. (Japan Organo Co.): JP 09308500 (1997); Chem. Abstr. 128, 76799 (1998).
25. Sinha C., Gehlawat J. K.: Indian J. Chem. Technol. 2, 171 (1995).
26. Godbole S. S., Kubal B. S., D'Souza S. F.: Enzyme Microbiol. Technol. 12, 214 (1990).
27. Krastanov A.: Appl. Microbiol. Biotechnol. 47, 476 (1997).
28. Vygovskaya E. L., El'chits S. V.: Pishch. Prom-st. 37, 102 (1991).
29. Garncarek Z., Garncarek B.: Pr. Nauk. Akad. Ekon. im. Oskara Langego Wroclawiu 605, 7 (1991); Chem. Abstr. 117, 88675 (1992).
30. Miyazawa F., Yoshihiro Y., Kida M., Yoshikawa T.: JP 02023869 (1990); Chem. Abstr., 113, 227141 (1990).
31. Zarin P. Ya., Ozola V. A., Kharald V.: SU 1824451 (1993); Chem. Abstr. 124, 149142 (1996).
32. Nakanishi N., Yokozuka K.: JP 04117297 (1992); Chem. Abstr. 117, 110146 (1998).
33. DeOliveira L., Antonio C., Ferreira C. M., Nakamura L. M. K., Ferreira V. F.: BR 9602893 (1987); Chem. Abstr. 108, 188787 (1988).
34. Rearick D. E., Olmstead L. J.: Proc. Sugar Process. Res. Conf. 1992, 1993, 97; Chem. Abstr. 119, 141490 (1993).
35. Kulhanek M., Tadra M.: CS 244023 (1987); Chem. Abstr. 110, 58001 (1989).
36. Reinefeld E.: Zuckerindustrie 12, 1049 (1987).
37. Kim W. K., Chun U. H., Young M., Kim C. H., Choi E. S., Rhee S. K.: Process Biochem. 29, 277 (1994).
38. Rehr B., Sahm H.: DE 4017103 (1991); Chem. Abstr. 116, 104489 (1992).
39. Heikkila H., Hyoky G., Niittymaki P., Viljava T., Myohanen T.: WO 9207097 (1992); Chem. Abstr. 117, 29136 (1992).
40. Dorta A., Dhingra Y. R., Pynnonen B. W.: US 5176832 (1993); Chem. Abstr. 118, 235560 (1993).
41. Saska M., Clarke S. J., Wu M. D., Iqbal K.: Int. Sugar J. 93, 223 (1991).
42. Strube J., Haumreisser S., Schmidt-Traub H., Schulte M., Ditz R.: Org. Process Res. Dev. 2, 305 (1998).
43. Gallezot P.: Catal. Today 37, 405 (1997).
44. Asakura A., Hoshino T., Masuda S., Setoguchi Y.: WO 9218637 (1992); Chem. Abstr. 118, 5761 (1993).
45. Quirasco-Baruch M., Iturbe-Chinas F., Novak M. F., Lopez-Munguia A.: Rev. Latinoam. Microbiol. 35, 273 (1993); Chem. Abstr. 121, 228885 (1997).
46. Rosenberg M., Svitel J., Rosenbergoval I., Sturdik E.: Acta Biotechnol. 12, 311 (1992).
47. Jokic M. M., Ristic N., Kotorcevic M., Simovic D., Lacnjevac C., Jaksic M. M.: Hem. Ind. 50, 414 (1996); Chem. Abstr. 126, 104320 (1996).
48. Elseviers M., Lemmens H. O. J., Coomans S. M. J., Roper H. W. W.: EP 820979 (1998); Chem. Abstr. 128, 140962 (1998).
49. Rapp K. M.: US 4,740,605 (1988); Chem. Abstr. 107, 154231 (1987).
50. Martin T.: DE 19319075 (1997); Chem. Abstr. 128, 24278 (1998).
51. Rosenberg M., Kristofikova L., Richardson G. N., Shafizadeh F. D.: Aust. J. Chem. 31, 1825 (1978).
52. Kamya H., Kita H., Nobutaka T.: JP 02306988 (1990); Chem. Abstr. 114, 185924 (1991).
53. von Rybinski W., Hill K.: Angew. Chem. Int. Ed. 37, 1328 (1998).
54. Defaye J., Wong E., Pedersen C.: FR 2,567,891 (1986); Chem. Abstr. 105, 227221 (1986).
55. Bouchu A., Chedin J., Defay J., Lafont D., Wong E.: FR 2,599,040 (1987); Chem. Abstr. 109, 95053 (1988).
56. Badel A., Descotes G., Mentech J.: Carbohydr. Res. 205, 323 (1990).
57. Fechter M. H., Stutz A. E.: J. Carbohydr. Chem. 16, 1293 (1997).
58. Leupold E. I., Schoenwaelder K. H., Fritsche-Lang W., Schlingmann M., Linkies A. H., Gohla W., Dany F. J.: DE 3900677 (1990); Chem. Abstr. 113, 214316 (1990).
59. Rosenberg M., Kristofikova L.: SK 278555 (1997); Chem. Abstr. 129, 342744 (1998).
60. Dominguez J. M., Cao N., Gong C. S., Tsao G. T.: Polym. Prep. 39, 282 (1998).
61. Du J., Cao N., Gong C. S., Tsao G. T.: Appl. Biochem. Biotechnol. 70–72, 323 (1998).
62. Reinefeld E.: Zuckerindustrie 12, 1049 (1987).
63. Akutsu F., Inoki M., Uei H., Sueyoshi M., Kasashima Y., Naruchi K., Yamaguchi Y., Sunahara M.: Polym. J. 30, 421 (1998).
64. Koyanagi K., Shibamoto M., Sumihiro Y., Fukushima T., Hashimoto N., Sakai T.: JP 10231358 (1998); Chem. Abstr. 129, 189815 (1998).
65. Sumihiro Y., Yukihiro S., Tadamoto K., Kunihiro F., Takeshi Y., Sakai T., Koyanagi K., Fukushima T., Hashimoto N.: JP 10101783 (1998); Chem. Abstr. 128, 295217 (1998).
66. Kuyama H., Ota M.: JP 09296102 (1997); Chem. Abstr. 128, 35509 (1998).
67. Kobayashi D., Tsubuku S., Yamanaka H., Asano M., Miujima M., Yoshida M.: Drug. Dev. Ind. Pharm. 24, 819 (1998).
68. Wang N., Wu X. S.: J. Biomater. Sci., Polym. Ed. 9, 75 (1997).
69. Naganushi Y., Imanashi Y., Nagato Y., Takada S., Sato K.: JP 10130153 (1998); Chem. Abstr. 129, 12737 (1998).
70. Ingram L. O., Gomez P. F., Lai X., Monirurraman M., Wood B. E., Yoomano L. P., York S. W.: Biotechnol. Bioeng. 58, 204 (1998).
71. Cameselle C., Bohlmann J. T., Nunez M. J., Lema J. M.: Bioprocess Eng. 19, 247 (1998).
72. Andrews M. A., Klaeren S. A., Gould G. L., v knize: *Carbohydrates as Organic Raw Materials II* (Descotes E., ed.). VCH, Weinheim 1993.
73. Woodward J., Orr M.: Biotechnol. Prog. 14, 897 (1998).
74. Ardizzone S., Petrillo M., Antonacci C. M., Porro G. B.: Aliment. Pharmacol. Ther. 10, 957 (1996).
75. Reynolds R. C., Chappel C. I.: Food Chem. Toxicol. 36, 81 (1998).

76. Keller G., Kuester J.: DE 19619216 (1997); Chem. Abstr. 128, 23631 (1998).
77. Parker W. J., Khan R. A., Mufti K. S.: GB 1,399,053 (1973); Chem. Abstr. 82, 100608 (1975).
78. Tutin K.K.: US 5710239 (1998); Chem. Abstr. 128, 115406 (1998).
79. Fairclough P. H., Hough L., Richardson A. C.: Carbohydr. Res. 40, 285 (1975).
80. Hough L.: GB 1543168 (1979); Chem. Abstr. 91, 193577 (1979).
81. Khan R. A., Sankey G. H., Simpson P. J., Vernon N. M.: EP 260979 (1988); Chem. Abstr. 113, 152966 (1990).
82. Simpson P. J.: US 4889928 (1989); Chem. Abstr. 113, 6739 (1990).
83. Jones J. D., Hacking A. J., Cheetham P. S. J.: Biotechnol. Bioeng. 39, 203 (1992).
84. Reinefeld E., Heincke K. D.: Chem. Ber. 104, 265 (1971).
85. Lichtenthaler F. W., Himmel S., Martin D., Müller V., v knize: *Carbohydrates as Organic Raw Materials II* (Descotes E., ed.), str. 59. VCH, Weinheim 1993.
86. Chin A. K. B., Hough L., Richardson A. C., Toufeili I. A., Dziedzic S. Z.: Carbohydr. Res. 162, 316 (1987).
87. Fanton E.: J. Org. Chem. 46, 4057 (1981).
88. Sarney D. B., Barnard M. J., MacManus D. A., Vulson E. N.: J. Am. Oil Chem. Soc. 73, 1481 (1996).
89. Stoppok E., Matalla K., Buchholz K.: Appl. Microbiol. Biotechnol. 36, 604 (1992).
90. Schwengers D., Benecke H.: EP 185 302 (1985); Chem. Abstr. 105, 77815 (1986).
91. Kunz M., v knize: *Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, sv. 25A, str. 426. VCH, Weinheim 1994.
92. Bucke C., Cheetham P. S. J.: GB 2063268 (1980); Chem. Abstr. 95, 95468 (1981).
93. Lichtenthaler F. W., Martin D., Weber T. A., Schiweck H. M.: EP 426.176 (1990); Chem. Abstr. 115, 92826 (1991).
94. Röger H., Puke H., Kunz M.: Zuckerindustrie 115, 174 (1990).
95. Fuji S., Komoto K.: Zuckerindustrie 116, 197 (1991).

J. Moravcová (*Department of Chemistry of Natural Compounds, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Sucrose as Raw Material**

The potential of sucrose as a raw material obtained from renewable resources is discussed in terms of its degradation to compounds with a lower number of carbon atoms, modification of all hydroxy groups, synthesis of polymers, other chemical transformations of sucrose, and the enzymatic oligosaccharide synthesis.

DERIVÁTY ELIPTICINU S CÍLENÝM PROTINÁDOROVÝM ÚČINKEM

MARIE STIBOROVÁ^a a EVA FREI^b

^aKatedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Albertov 2030, 128 40 Praha 2, ^bInstitut für Molekulare Toxikologie, Deutsches Krebsforschungszentrum, Im Neuenheimer Feld 280, 69120 Heidelberg
e-mail: stiborov@prfdec.natur.cuni.cz

Došlo dne 6.II.2001

Klíčová slova: elipticin, mechanismus působení, cíleně směrovaná protinádorová léčiva

Obsah

1. Elipticiny a jejich protinádorové účinky
2. Derivatizace molekuly elipticinu
3. Charakterizace cíleně směrovaných derivátů elipticinu
 - 3.1. Konjugát derivátů elipticinu s heptagastrinem
 - 3.2. Konjugáty elipticinu a 9-hydroxyelipticinu s enkefaliny
 - 3.3. Konjugáty elipticinu s estradiolem
 - 3.4. Konjugáty elipticinu se sacharidy
 - 3.5. Komplexy esterů elipticinu s lipoproteiny
 - 3.6. Konjugát elipticinu s lidským sérovým albuminem
4. Závěr

1. Elipticiny a jejich protinádorové účinky

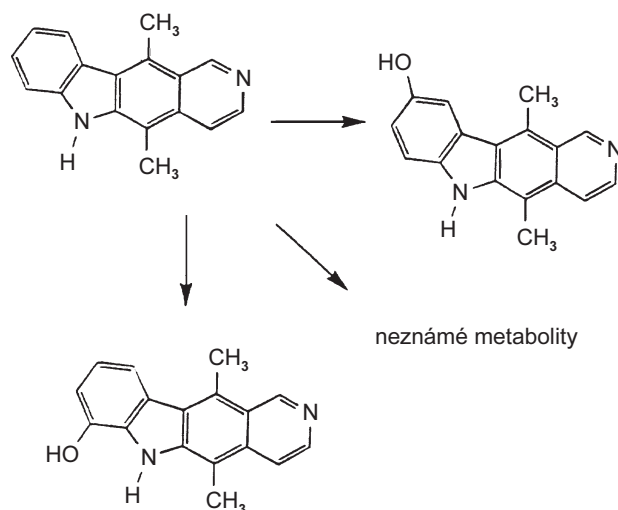
Elipticin (5,11-dimethyl-6H-pyrido[4,3-b]karbazol, obr. 1) a některé jeho deriváty jsou alkaloidy rostlin čeledi *Apocynaceae* vykazující významnou protinádorovou aktivitu¹⁻⁴. Elipticin samotný a jeho deriváty 9-hydroxyelipticin a 9-hydroxy-2-methylelipticin (ve formě acetátu) jsou užívány zejména k léčení pokročilého karcinomu prsu s kostními metastázami, akutní myeloblastické leukémie, sarkomů ledvin a karcinomu štítné žlázy⁵⁻¹⁰. Důvody zájmu o klinické využití elipticinu jsou dva: 1) vysoká účinnost proti nádorovým onemocněním (elipticin je cytotoxický vůči nádorovým buňkám již v koncentracích řádově rovných 0,1–1 μM) a 2) jeho relativně nízké vedlejší toxické účinky. Limitující toxicitou je xerostomie (asialie), která může vyvolávat další nežádoucí účinky (monilázy, anorexie)⁹. Až na nefrotoxicitu podobnou svým mechanismem vzniku nefrotoxicitě cisplatinu, jsou další vedlejší toxické účinky elipticinu minimální. Hematologická toxicita je dokonce prakticky nulová^{9,11}.

V organismu potkana je elipticin metabolizován oxidačními reakcemi za tvorby 9-hydroxyelipticinu a 7-hydroxyelipticinu jakožto majoritních metabolitů¹² (obr. 1). C-Hydroxylace elipticinu v poloze C9 přitom vede ke zvýšení farmakologického účinku parentální molekuly, naopak v poloze C7

k jeho snížení¹³. Cytochromy P450 (CYP) jsou stěžejními enzymy, které elipticin či jeho deriváty metabolizují; CYP1A1 ev. CYP1A2 jsou přitom považovány za enzymy oxidující elipticiny nejefektivněji. Nelze však vyloučit, že se na metabolismu elipticinu mohou podílet i další, dosud nezjištěné isoenzymy cytochromu P450. Zda jsou elipticiny oxidovány uvedenými enzymy i v lidském organismu, nebylo dosud potvrzeno; k objasnění této problematiky je třeba dalších, detailnějších studií. Důležitým poznatkem ve vztahu k cytochromům P450 je rovněž skutečnost, že elipticin působí jako induktor jeho dvou isoenzymů, CYP1A1 a CYP1B1 (cit.^{17,18}).

Elipticin a jeho 9-hydroxyderivát jsou silnými mutageny vykazujícími mutagenní aktivitu vůči kmenům *Salmonella typhimurium*, *Neurospora crassa*, *Escherichia coli* a jsou mutagenní i vůči buňkám savcům¹⁹.

Elipticiny patří do skupiny protinádorových léčiv, jejichž mechanismus účinku není ještě přesně rozluštěn. Předpokládá se, že převládajícími mechanismy protinádorového účinku jsou i) interkalace do dvojšroubovicové struktury DNA, která vyplývá z velikosti a tvaru molekuly elipticinu a ii) jeho působení jako inhibitor topoisomerasy II (cit.¹³). Interkalace elipticinu je způsobena slabými reverzibilními hydrofobními interakcemi mezi spárovanými bázemi molekuly DNA (cit.¹³). Interakce mezi methylovou skupinou elipticinu a thyminem v interkalačním místě je určující pro orientaci této sloučeniny v DNA (cit.²⁰). Vzhledem ke svému fluorescenčním vlastnostem slouží elipticin i v řadě studií řešících obecné principy interkalace jako modelová sloučenina^{20,21}. Poznání mechanismu působení elipticinu jako inhibitoru topoisomerasy II je rovněž předmětem intenzivního výzkumu²²⁻²⁴. Elipticin, oproti jiným inhibitorům topoisomerasy II, interaguje buď s molekulou DNA nebo s proteinem topoisomerasy II za tvorby ternárního komplexu. Vzniklý ternární komplex, který je katalyticky inaktivní, pak výsledně vede ke stimulaci tvorby řetězových zlomů v DNA (cit.²⁴).



Obr. 1. Schéma metabolické oxidace elipticinu

Zajímavým zjištěním, které může k vysvětlení mechanismu protinádorového působení elipticinu také přispět, je poznatek, že elipticin a 9-hydroxyelipticin způsobují selektivní inhibici fosforylace produktu tumorového supresorového genu, proteinu p53 (cit.²⁵). Inhibice fosforylace proteinu p53 je pravděpodobně způsobena inhibicí specifické cyklin-dependentní kinasy (cit.²⁵). Nahromadění defosforylovaného proteinu p53 pak může vyústit v indukci apoptózy. Vedle uvedených mechanismů může elipticin fungovat i mechanismem dalším. Inhibuje oxidační fosforylaci, která vede ke drastickému snížení obsahu ATP v buňkách, což rezultuje v jejich zánik²⁶. Působí také jako inhibitor telomerasy¹³.

Všechna uvedená vysvětlení mechanismu protinádorové aktivity elipticinů jsou založena na nespecifickém působení. Tato skutečnost však ostře kontrastuje s poměrně úzkou specifitou jejich účinku vůči nádorovým onemocněním. Jsou specifické pouze k určitým typům neoplasie. Velmi důležitým aspektem pozorovaným při terapii užívající elipticiny je navíc individuální variabilita v odpovědi pacientů na podané léčivo. Účinek elipticinů je tedy specifický i pro individuální osoby (pacienty). Je tudíž nanejvýš pravděpodobné, že specifické působení elipticinu musí vycházet (být odvozeno) ještě z principů jiných, dosud neodhalených. Jedním z vysvětlení specifity chemoterapeutického účinku i selektivní odpovědi na podané léčivo může být rozdílná enzymová výbava lidského organismu takovými enzymy, které jsou důležité pro biotransformaci elipticinu. Příslušné enzymy mohou aktivovat léčivo na terapeuticky účinnější derivát, který pak buňky novotvaru poškozuje efektivněji, popř. způsobí až jejich likvidaci.

Souvislostí mezi metabolickou aktivací elipticinu a jeho působením jako protinádorového léčiva se dosud nikdo detailně nezabýval. Interkalovány jsou totiž samotný elipticin či jeho majoritní metabolit 9-hydroxyelipticin (nebo další terapeuticky užívané deriváty), a to bez jejich aktivace. Také vazba těchto sloučenin na DNA a topoisomerasu II vedoucí k tvorbě řetězových zlomů v DNA nevyžaduje jejich metabolické změny. Zda protinádorová chemoterapeutika na bázi elipticinů působí také prostřednictvím mechanismu, který je podmíněn jejich metabolickou aktivací, řešíme v grantovém projektu podporovaném GA ČR (grant 203/01/0996).

V předkládaném článku shrnujeme poznatky o nových trendech využití elipticinových derivátů jako kancerostatik. V tomto případě se jedná o poznatky informující o vývoji účinnějších elipticinových protinádorových léčiv, která jsou cíleně specifická vůči nádorovým buňkám.

2. Derivatizace molekuly elipticinu

V řadě laboratoří byla připravena široká škála derivátů základního skeletu elipticinu. Účelem takových úprav molekuly elipticinu bylo především: *i*) zvýšení protinádorového účinku, *ii*) modulace hydrofobicity molekuly ve smyslu zvýšené rozpustnosti, ale i účinnější absorpce léčiva nádorovými buňkami a *iii*) zvýšení selektivity léčiva pro nádorové buňky, tedy příprava cíleně směřovaného protinádorového léčiva na bázi elipticinu.

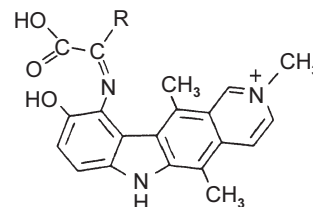
Významným místem pro derivatizaci elipticinového skeletu je atom uhlíku v poloze 9 molekuly léčiva. Zvýšený protinádorový účinek vykazují deriváty elipticinu substituované v této poloze, a to hydroxylovaný derivát, který je rovněž

majoritním metabolitem elipticinu v lidském organismu, dále pak 9-methoxyelipticin a 9-chlorelipticin. Další místo důležité pro derivatizaci molekuly elipticinu je atom dusíku v poloze 2. 9-Hydroxy-2-methylelipticinium (ve formě acetátu) je proti nádorům prsu s kostními metastázami i jako léčivo protileukemické nejučinnějším derivátem elipticinu. Další derivát, 9-methoxy-2-methylelipticinium-acetát, je cytotoxický vůči buněčným liniím nádorů mozku, experimenty *in vivo* však neprokázaly jeho účinnost vůči pevným nádorům²⁷. Naproti tomu 9-chlor-2-methylelipticinium-acetát je vůči pevným nádorům mozku vysoce efektivní.

Výše uvedené derivatizace molekuly elipticinu vedou nejen ke zvýšení protinádorové účinnosti, ale derivatizací je silně pozměněn i hydrofobní charakter léčiva. U léčiva musí být zachován optimální poměr mezi jeho hydrofobními a hydrofilními vlastnostmi. Nízká rozpustnost snižuje možnost jeho distribuce v organismu, a ovlivňuje se tak i jeho farmakokinetika a farmakodynamika. Vysoká polarita pak naopak snižuje transport léčiva přes buněčnou membránu do buněk. Elipticin je efektivně transportován přes buněčnou membránu, a to prostou, pasivní difuzí. Derivatizace na dusíku v poloze 2 vytváří z molekuly elektricky nabitou částici, uvedené deriváty elipticinu jsou proto používány ve formě solí, nejčastěji ve formě acetátu. Zmíněnou derivatizací dochází sice k lepší distribuci léčiva v organismu, naopak však k výraznému zhoršení transportních vlastností léčiva přes buněčnou membránu. Takto velká nabitá a hydrofilní molekula je přes buněčnou membránu transportována mnohem hůře než elipticin samotný. Pro odstranění tohoto jevu byly připraveny konjugáty 9-hydroxy-2-methylelipticinia s hydrofobními aminokyselinami glycinem, alaninem, kyselinou α -aminomáselnou, valinem, leucinem a isoleucinem navázanými na uhlík 10 molekuly léčiva^{28,29}. Struktura takových derivátů je uvedena na obr. 2. Všechny konjugáty s aminokyselinami byly do nádorových buněk transportovány efektivněji (podobně jako elipticin pasivní difuzí), většina konjugátů (vyjma konjugátu s isoleucinem) však vykazovala nižší protirakovinnou účinnost^{28,29}.

Ke zvýšení rozpustnosti elipticinu byly rovněž využity komplexy elipticinu (a jeho 9-hydroxyderivátu) s γ - a β -cyklodextriny. Elipticiny nekovalentně vázané do cyklodextrinů však nebyly testovány z hlediska jejich transportních vlastností (distribuce) v organismu ani z hlediska jejich kancerostatických účinků³⁰.

Optimálním řešením úpravy molekuly protirakovinného léčiva ve smyslu změny jeho vlastností nejen fyzikálně-chemických, ale i biologických a terapeutických, je příprava cíleně směřovaných derivátů léčiv. Takové úpravy léčiva vedou ke zlepšení jeho distribuce v lidském organismu, op-



Obr. 2. Struktura konjugátů 9-hydroxy-2-methylelipticinia (NMHE) s aminokyselinami: Gly-NMHE, R = H; Ala-NMHE, R = CH₃; Val-NMHE, R = CH(CH₃)₂; Lue-NMHE, R = CH₂CH(CH₃)₂

timálně bez vlivu na zdravé buňky a k selektivnímu příjmu léčiva pouze nádorovými buňkami.

3. Charakterizace cíleně směřovaných derivátů elipticinů

Většina kancerostatik jsou nízkomolekulární látky, které nepůsobí místně specificky a relativně rychle se vylučují z organismu. Protože je třeba zajistit působení léčiva ve vhodné terapeuticky účinné koncentraci po delší dobu, je nezbytné podávat vhodnou dávku léčiva opakovaně, v určitých časových intervalech. I v takovém případě však léčivo nepůsobí pouze v místě požadovaného terapeutického efektu, tedy pouze na nádorové buňky. S tím je spojeno riziko vedlejších, často toxických účinků léčiva, které jsou právě u kancerostatik velmi závažným problémem. To vše platí i pro elipticin a jeho deriváty. I když jsou vedlejší toxické účinky elipticinu nižší než u jiných protirakovinných léčiv, je jejich snížení pro zdravé buňky organismu stále vysoce žádoucí a aktuální.

Jeden ze směrů přípravy cíleně směřovaných kancerostatik využívá jejich navázání na nosič obsahující tzv. determinantu cíleného transportu (cíleného účinku)^{31,32}. Výsledkem je konjugát léčiva s determinantou. Determinantou cíleného účinku je molekula, která je schopná rozpoznat povrchové receptory nádorových buněk, a k těmto receptorům celou molekulu (konjugát) specificky zavést. Kancerostatikum je v tomto případě dopravováno organismem ve své, v ideálním případě biologicky neaktivní formě, a k jeho vlastní aktivaci dochází až po průniku konjugátu do cílových nádorových buněk.

Úspěšně cíleně směřované léčivo musí splňovat následující kritéria:

- 1) Léčivo musí být cíleně směřované k receptoru, který je v nádorových buňkách přítomný v signifikantně vyšším množství než v buňkách zdravých tkání. Determinanta cíleného účinku musí mít navíc k receptorům, které jsou přítomné na povrchu nádorových buněk, vysokou afinitu.
- 2) Receptor se po rozštěpení konjugátu v nádorové buňce uvolní a měl by být zpětně recyklován do buněčného povrchu, aby mohl být opět léčivem rozpoznán. Je třeba, aby působil jako „pumpa“, která transportuje větší množství léčiva do buněk. Tento požadavek je obzvlášť důležitý, neboť počet molekul receptorů v cílové buňce zřídka přesahuje hodnotu 10^6 (cit.³³).
- 3) Konjugát musí být v průběhu cirkulace (transportu) léčiva v organismu stabilní; naproti tomu musí být snadno hydrolyzován lysosomálními hydrolytickými enzymy.
- 4) Účinná složka konjugátu (vlastní nemodifikované kancerostatikum) musí vykazovat extrémně vysokou toxicitu uvnitř nádorových buněk s hodnotami IC_{50} v rozmezí nM–μM.
- 5) Konjugát nesmí vykazovat imunogenní aktivitu (musí být neimunogenní).

Návrh a syntéza nadějných přípravků s cíleným kancerostatickým účinkem vychází z využití receptorů pro i) růstové faktory^{34–36}, ii) cytokiny^{37,38}, iii) steroidní i peptidové hormony^{39,40} nebo iv) monoklonální protilátky⁴¹ či využití lektinů – tedy ve všech případech domén přítomných na povrchu určitých typů nádorových buněk. Jinou možností je využití skutečnosti, že některé typy nádorových buněk vyžadují pro svůj růst a vývoj či proliferaci určité sloučeniny (nízko- i vy-

sokomolekulární) v daleko vyšších koncentracích než buňky zdravých tkání. Takové sloučeniny pak mohou být využity jako nosiče protinádorově účinné látky.

Elipticin a některé jeho deriváty se jeví jako kancerostatika vhodná pro přípravu cíleně směřovaných protinádorových léčiv. Jak již bylo uvedeno, jedná se o silně hydrofobní sloučeninu s výraznou cytotoxicitou pro nádorové buňky a poměrně nízkými vedlejšími účinky.

Do současnosti byla popsána příprava několika konjugátů elipticinu, které byly testovány jako potenciální cíleně směřovaná protirakovinná léčiva.

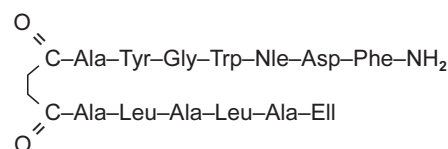
3.1. Konjugát derivátu elipticinu s heptagastrinem

V roce 1998 bylo Michejdou a jeho spolupracovníky⁴² popsáno, že gastrointestinální (GI) hormon, gastrin, stimuluje růst některých gastrointestinálních nádorů. Receptor typu B pro uvedený hormon (gastrin) a eventuálně rovněž pro cholecystokinin je exprimován v mnoha druzích uvedených nádorů. Tento receptor patří do rodiny receptorů spojených s G proteinem, pro něž je charakteristická přítomnost sedmi transmembránových domén. Gastrin cirkulující v organismu je peptid, u něhož je pro vazbu na jeho specifický receptor absolutně nezbytný C-terminální tetrapeptid. Na bázi výše uvedených poznatků byl Michejdovou pracovní skupinou připraven konjugát C-terminálního heptapeptidu gastrinu (heptagastrin Ala-Tyr-Gly-Trp-Nle-Asp-Phe-NH₂), který byl připojen k derivátu elipticinu, 1[3-[N-(3-aminopropyl)-N-methylamino]propyl]amino-(9-methoxy-5,11-dimethyl-6H-pyrido[4,3-b]karbazolu, prostřednictvím sukcinylovaného pentapeptidu Ala-Leu-Ala-Leu-Ala (obr. 3). Elipticin je vázán k terminálnímu alaninu přes atom dusíku v poloze 2 elipticinového skeletu.

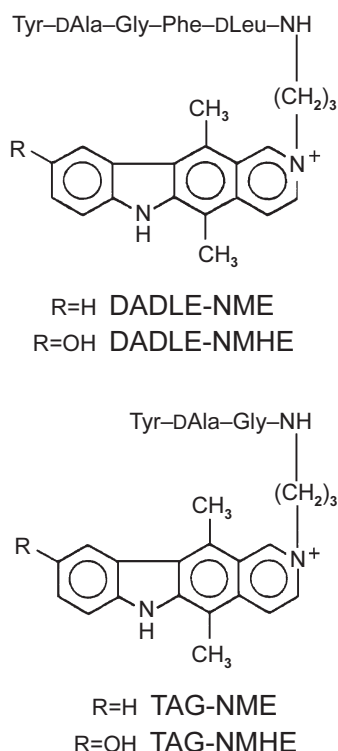
Syntetizovaný konjugát se specificky váže na receptor pro gastrin/cholecystokinin přítomný v NHI/3T3 buňkách, zatímco s povrchem divokého typu těchto buněk (neobsahujících receptor) neinteraguje. Endocytosou (pinocytosou) je komplex konjugátu s receptorem transportován do buněk a ukládán do endosomů. Receptor je s velkou efektivitou recyklován do buněčného povrchu, zatímco peptidový ligand (konjugát) dosahuje lysosomy. Pravděpodobně právě v lysosomech je pak konjugát degradován, a volný elipticin pak může v nádorové buňce působit jako cytotoxické agens⁴².

3.2. Konjugáty elipticinu a 9-hydroxyelipticinu s enkefalinou

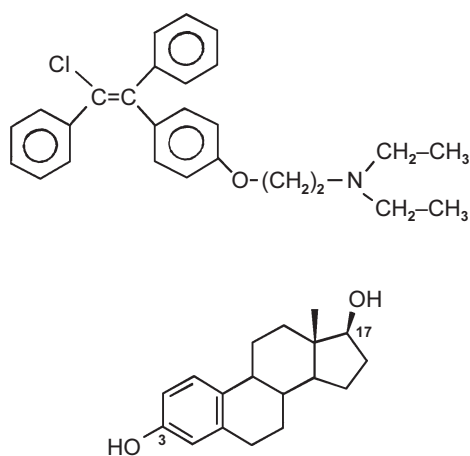
Enkefaliny (Leu-enkefalin, Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu, a Met-enkefalin, Tyr-Gly-Gly-Phe-Met) patří spolu s β-endorfinem mezi peptidové hormony, které působí na centrální nervovou soustavu podobně jako opiáty. Jsou proto někdy označovány jako opioidní (opiátové) peptidy. Vážou se na opiátové receptory mozkových buněk, jsou jejich fyziologickými agonisty.



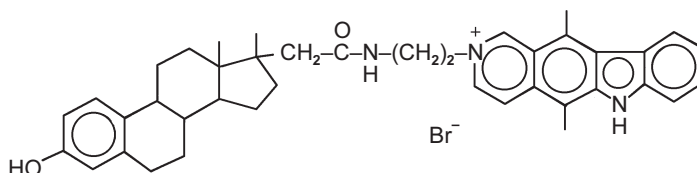
Obr. 3. Konjugát elipticinu s heptagastrinem



Obr. 4. Chemická struktura konjugátů elipticinů s enkefalinem (DADLE, D-Ala²-D-Leu⁵-enkefalin, Tyr-D Ala-Gly-Phe-D Leu-NH-(CH₂)₃-elipticin, NME, N²-methylelipticin, NMHE, 9-hydroxy-N²-methylelipticin)



Obr. 5. Struktura (*E*)-clonifenu a estradiolu



Obr. 6. Konjugát elipticinu s estradiolem

Zajímavé je zjištění, že lidské kolo-rektální karcinomy^{43,44} a malobuněčné plicní karcinomy⁴⁵, které jsou silně chemo-rezistentní, obsahují vysoké koncentrace enkefalinů a jejich receptorů. Těchto poznatků bylo využito Rigaudem se spolupracovníky^{41,46}, kteří připravili konjugáty uvedených peptidů s elipticinem a jeho 9-hydroxyderivátem. Struktura syntetizovaných konjugátů je uvedena na obrázku 4.

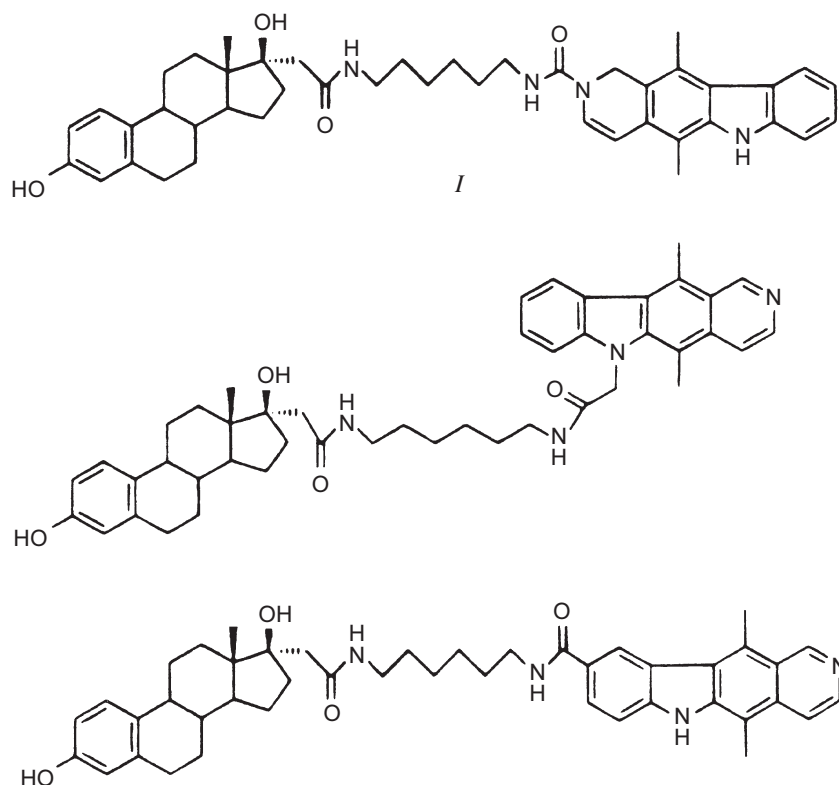
Připravené konjugáty, kterým zůstala zachována schopnost tvořit interkaláty s DNA, interagují s enkefalinovými receptory *in vitro* a jsou transportovány do nádorových buněk obsahujících uvedené receptory. Interakce s receptory je však velmi slabá a konjugáty vstupují i do buněk, které enkefalinové receptory neobsahují. Pro úspěšné cíleně směřované léčivo, které je připraveno na bázi směřování pro určitý receptor, je důležité, aby ta část molekuly konjugátu (kovalentního komplexu), která je vlastní aktivní složkou léčiva (elipticin) nehrála dominantní úlohu v transportu konjugátu. V případě konjugátů elipticinů s enkefaliny je pravděpodobné, že ztratily vlastnosti nezbytné pro rozpoznání receptorem. Elipticinová část molekuly převažuje z hlediska významu pro transport konjugátu do buněk, který je právě touto složkou zprostředkován pasivní difúzí (hydrofobní povaha molekuly léčiva)^{41,46}. Uvedené konjugáty tedy nemohou být využity jako cíleně směřovaná kancerostatika.

3.3. Konjugáty elipticinu s estradiolem

Růst endometria a téměř 30 % nádorů prsu je stimulován estrogeny. Z klinických studií vyplývá, že antagonisté estrogenů, antiestrogeny, mohou být užity k léčení nádorů závislých na estrogenech. Buněk některých nádorů prsu (např. karcinomu prsu) obsahují receptory pro estrogeny (jsou estrogen-receptor pozitivní) a významně koncentrují estrogeny v buněčném jádře^{47,48}. Mechanismus působení estrogenů a ev. také antiestrogenů je vysvětlován především jejich interakcí s celulárními receptory, které jsou pravděpodobně lokalizované v cytoplazmě i jádře buněk. Jak vyplývá z výše uvedeného, estrogeny a jejich antagonisté, antiestrogeny, by mohly být rovněž potenciálně dobrými přenašeči kancerostatik do buněk a dále do jader bohatých na receptory. Konkrétně kancerostatik, jejichž cílem jsou molekuly DNA.

K syntéze konjugátů elipticinů s estrogeny a antiestrogeny bylo použito antiestrogenu (*E*)-clonifenu [1-[4-[2-(diethylamino)ethoxy]-phenyl]-1,2-diphenyl-2-chloroethylen, obr. 5] a estrogenního hormonu estradiolu^{47,48} (obr. 5). Z mnoha syntetizovaných konjugátů pouze jediný (obr. 6) vykazoval stejnou cytotoxickou aktivitu jako elipticin⁴⁸. Jeho využití jako cíleně směřovaného léčiva na bázi elipticinu je však omezené. Transport uvedeného aktivního derivátu do nádorových buněk totiž není zprostředkován receptory pro estrogeny⁴⁸.

Dalšími konjugáty elipticinů s estrogeny jsou tři sloučeniny, které byly syntetizovány z elipticinu a estradiolu Devrajem



Obr. 7. Struktura konjugátů elipticinu s estradiolem

se spolupracovníky⁴⁷ (obr. 7). Ani v tomto případě nebyly připravené konjugáty úspěšnými cíleně směřovanými kancerostatiky. I když jeden z konjugátů (sloučenina I na obrázku 7) je dobrým inhibitem topoisomerasy II a jeho cytotoxicita vůči nádorovým buňkám je vysoká, tento konjugát nevykazuje selektivitu k estrogen-pozitivním buněčným liniím. Uvedená skutečnost pravděpodobně vyplývá ze slabé afinity konjugátu k estrogenním receptorům, která je způsobena modifikací molekuly estradiolu derivátem elipticinu⁴⁷.

3.4. Konjugáty elipticinu se sacharidy

Podrobná studie konjugátů velké skupiny monosacharidů s elipticiny (elipticin, 9-hydroxyelipticin, 9-methoxyelipticin) (49 konjugátů) provedená Hondou se spolupracovníky⁴⁹ prokázala, že cukerná složka zvýšila terapeutickou účinnost léčiva. Všechny studované konjugáty mají cukernou složku vázanou na atom dusíku v poloze 2 elipticinového skeletu, jde tedy o kvarterní glykosidy. Dva ze studovaných glykosidů (L-arabinopyranosid a D-xylofuranosid 9-hydroxyelipticinu) jsou velmi slibnými kancerostatiky, jejichž účinnost vůči některým modelovým buněčným nádorovým liniím (L1210 leukemická linie, P388 leukemická linie, buňky B16 melanomu) je několikanásobně vyšší, než je účinnost elipticinu samotných⁴⁹. Mechanismus zvýšené účinnosti syntetizovaných glykosidů ani selektivita sorpce těchto látek nádorovými buňkami (cílové receptory) nebyly dosud studovány. O dalších preklinických studiích s uvedenými glykosidy, které byly autory v citované literatuře⁴⁹ slibovány, však dodnes nejsou informace.

3.5. Komplexy esterů elipticinu s lipoproteiny

Příprava dalších cílově směřovaných léčiv na bázi elipticinu vychází ze zcela jiného principu, než jsou principy výše popsané. Nádorové buňky, které se rychle replikují a nekontrolovaně proliferují, vyžadují pro syntézu buněčné membrány značná množství cholesterolu. Cholesterol musí být buď syntetizován z dvouhlíkatých jednotek *de novo* nebo může být dodán z degradovaných plazmatických lipoproteinů (low-density lipoprotein, LDL), jejichž je součástí. Nádorové buňky přitom obsahují receptory pro LDL a metabolizují tyto lipoproteiny daleko rychleji, než jsou lipoproteiny metabolizovány buňkami zdravými^{50–52}. LDL tedy mohou být využity jako nosič protirakovinných léčiv. Částice LDL s léčivými jsou komplexy, do kterých jsou léčiva inkorporována nekovalentními (hydrofobními) interakcemi. Hydrofobicita léčiva musí tedy být výrazná. Samotné komplexy LDL s léčivem jsou značně stabilní při transportu organismem, a dosahují tak cílové buňky v nezměněné podobě.

Derivát elipticinu (9-hydroxy-2-methylelipticinium-acetát) byl použit jako kancerostatická součást komplexů s LDL. Jeho polarita však neumožňovala inkorporaci do LDL. Proto byly z této sloučeniny syntetizovány estery s kyselinou stearovou, palmitovou a oleovou (estery kyselin s hydroxylovou skupinou v poloze 9 elipticinového skeletu). Jejich hydrofobicita pak již byla pro inkorporaci do LDL dostatečná. Z připravených esterů se do LDL nelépe inkorporoval oleát. Jeho komplex s LDL byl efektivně transportován po interakci s re-

ceptorem do nádorových buněk endocytosou, jeho cytotoxicita byla vyšší, než byla cytotoxicita volného léčiva⁵¹. Rovněž experimenty *in vivo* na myších melanomech B16 byly úspěšné⁵².

3.6. Konjugát elipticinu s lidským sérovým albuminem

Strategickým postupem ve zvýšení protirakovinné selektivity cancerostatik je využití transportních proteinů. Vhodným proteinem pro cíleně směřovanou cancerostatika se jeví sérový albumin. Lidský sérový albumin je vysokomolekulární látka o molekulové hmotnosti 66500. Již sama skutečnost, že jde o sloučeninu o vysoké molekulové hmotnosti, má určitý význam pro její využití jako nosiče cancerostatik. U konjugátů cancerostatik s vysokomolekulárním nosičem má totiž již samotná vysoká molekulová hmotnost proteinového nosiče pozitivní vliv na distribuci léčiva v organismu. Vede k až několikanásobnému zvýšení koncentrace konjugovaného léčiva v pevných nádorech ve srovnání s volným léčivem. Jde o tzv. pasivní směřování (passive tumor targeting) v důsledku EPR efektu (enhanced permeability and retention effect)⁵³. Vedle toho je lidský sérový albumin (HSA) vhodný jako proteinový přenašeč ještě z dalších důvodů.

- 1) Je pohlcován (absorbován) nádorovými buňkami specificky, zatímco k buňkám zdravých tkání má tento protein afinitu mnohonásobně nižší^{53,54}.
- 2) Je snadno dostupný protein, v organismu optimálně biologicky stabilní.
- 3) V nádorových buňkách je snadno degradován⁵³.
- 4) Pro lidský organismus je netoxický a neimunogenní⁵³.

Konjugát lidského sérového albuminu s elipticinem (HSA-elipticin) byl připraven teprve nedávno⁵⁵. Nádorovými buňkami (linie leukemických buněk Nalm6) je selektivně a efektivně přijímán a v buňkách pak hydrolyzován na volné léčivo a proteinový nosič⁵⁵. Vykazuje vysokou cytotoxicitu vůči testovaným nádorovým buňkám, obdobnou jako volný elipticin ($IC_{50} = 2 \mu M$). Ačkoliv jeho účinnost v experimentech *in vivo* nebyla zatím studována, z testování na buněčných liniích *in vitro* se jeví jako nadějně cíleně směřované léčivo⁵⁶.

4. Závěr

Předkládaný článek ukazuje nové směry vývoje a přípravy cíleně směřovaných léčiv na bázi elipticinu a zobecňuje poznatky o vlastnostech, které taková léčiva musí splňovat. Zhodnocení kvality cíleně směřovaných derivátů elipticinu jako cancerostatik s cíleným účinkem je však v současnosti ještě poněkud obtížné. Z výše uvedených poznatků vyplývá, že nově syntetizovaných derivátů, které vykazují zvýšený protinádorový efekt a selektivitu, je doposud malý počet. Navíc, řada těchto derivátů nebyla ještě dostatečně testována ani v klinických studiích, ba ani v experimentech *in vivo*, na živočišných modelech. Nicméně terapeuticky slibné se zdají být především konjugáty elipticinu s heptagastrinem a elipticinu s lidským sérovým albuminem. Proto je příprava obou typů léčiv také předmětem patentních řízení^{42,56}. Vedle potenciálního terapeutického využití, předpokládáme jejich použití i k osvětlení mechanismu protinádorového účinku elipticinu, jehož podstatu v našich laboratorních detailně studujeme.

Autorky děkují za podporu Německému centru výzkumu rakoviny a grantům GA ČR (203/01/0996) a MŠMT ČR (MSM 1131 00001).

LITERATURA

1. Dalton L. K., Demerac S., Elmes B. C., Loder J. W., Swan J. M., Teitei T.: Aust. J. Chem. 20, 2715 (1967).
2. Le Pecq J. B., Dat Xuong N., Gosse C., Paoletti C.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71, 5078 (1974).
3. Rouesse J. G., Le Chevalier T., Caille F., Mondesir J. M., Sancho-Ganier H., May-Levin E., Spielman M., DeJager R., Amiel J. L.: Cancer Treat. Rep. 69, 707 (1985).
4. Mathé G., Triana K., Pontiggia P., Blanquet D., Hallard M., Morette C.: Biomed. Pharmacother. 52, 391 (1998).
5. Juret P., Tanguy A., Girard A.: Nouv. Presse Med. 8, 1495 (1979).
6. Juret P., Heron J. F., Couette J. E., Delozier T., Letalaer J. Y.: Cancer Treat. Rep. 66, 1909 (1982).
7. Mathé G., Hayat M., De Vassal F., Schwarzenberg L., Schneider M., Schlumberger J. R., Jasmin C., Rosenfeld C.: Rev. Eur. Etud. Clin. Biol. 15, 541 (1970).
8. Caillé P., Monesir J. M., Droz J. P., Kebert P., Goodman A., Ducret J. P., Theodore C., Spelman M., Rouesse J., Amiel J. L.: Cancer Treat. Rep. 69, 901 (1985).
9. Klener P.: *Protinádorová chemoterapie*. Galén, Praha 1996.
10. Arguello F., Alexander M. A., Greene J. F. Jr., Stinson S. F., Jorden J. L., Smith E. M., Kalavar N. T., Alword W. G., Klabansky R. L., Sausville E. A.: J. Cancer Res. Clin. Oncol. 124, 19 (1998).
11. Diop B., Toure P., Sow M. T., Toure M., Halliez M. L., Castaigner J. P., Mondestr J. M., DeJaeger R.: Med. Afr. Noire 31, 107 (1984).
12. Lesca P., Monsarrat B., Cros S., Paoletti C.: J. Natl. Cancer Inst. 67, 871 (1981).
13. Auclair C.: Arch. Biochem. Biophys. 259, 1 (1985).
14. Stiborová M., Hudeček J., Hodek P., Frei E.: Chem. Listy 93, 229 (1999).
15. Lesca P., Beauner P., Monsarrat B.: Chem.-Biol. Interactions 36, 299 (1981).
16. Tassaneeyakul W., Birkett D. J., Veronese M. E., McManus M. E., Tukey R. H., Gelboin H. V., Miners J. O.: J. Pharmacol. Exp. Ther. 265, 401 (1993).
17. Gasiewicz T. A., Kende R. S., Rucci G., Whitney B., Willey J. J.: Biochem. Pharmacol. 52, 1787 (1996).
18. Chang C.-Y., Puga A.: Mol. Cell. Biol. 18, 525 (1998).
19. De Marini D. M., Abu-Shakra A., Gupta R., Hender L. J., Levine J. E.: Environ. Mol. Mutagen. 20, 12 (1992).
20. Singh M. P., Hill G. C., Peoc'h D., Rayner B., Imbach J. L., Lown J. W.: Biochemistry 33, 10271 (1994).
21. Chu Y., Hsu M. T.: Nucleic Acid Res. 20, 4033 (1992).
22. Monnot M., Mauffret O., Simon V., Lescot E., Psaume B., Saucier J. M., Charra M., Belehadek J. Jr., Fermandjian S.: J. Biol. Chem. 25, 1820 (1991).
23. Fosse P., Rene B., Chrra M., Paoletti C., Saucier J. M.: Mol. Pharmacol. 42, 590 (1992).
24. Froelich-Ammon S. J., Patchan M. W., Osheroff N., Thopson R. B.: J. Biol. Chem. 270, 14998 (1995).
25. Ohashi M., Sugikawa E., Nakanishi N.: Jpn J. Cancer Res. 86, 819 (1995).

26. Schwaler M. A., Allard B., Lescot E., Moreau F.: J. Biol. Chem. 270, 22709 (1995).
27. Sriram K., Boyd M. R., Vistica D. T., Ravindranath V.: Neurotoxicology 18, 97 (1997).
28. Auclair C., Voisin E., Banoun H., Paoletti C., Bernadou J., Meunier B.: J. Med. Chem. 27, 1161 (1984).
29. Larsen A. K., Paoletti J., Belehradek J. Jr., Paoletti C.: Cancer Res. 46, 5236 (1986).
30. Sbai M., Ait Lyazidi S., Lerner D. A., de Castillo B., Martin M. A.: Biomed. Chromatogr. 11, 89 (1997).
31. Ulbrich K.: Chem. Listy 89, 30 (1995).
32. Gregoriadis G., Senior J., Trouet A.: *Targeting of Drugs*. Plenum Press, New York 1981.
33. Frucht H., Gazdar A. F., Park J.-A., Olie H., Jensen R. T.: Cancer Res. 52, 1114 (1992).
34. Kibara A., Pastau I.: Cancer Res. 55, 71 (1995).
35. Carpenter G.: Curr. Opin. Cell Biol. 5, 261 (1993).
36. Lemaistre C. F., Meneghetti C., Howes L., Osborne C. K.: Breast Cancer Res. Treat. 32, 97 (1994).
37. Strom T. B., Kelley V. R., Murphy J. R., Nichols J., Woodworth T. G.: Annu. Rev. Med. 44, 343 (1993).
38. Waldmann T. A., Pastau I. H., Gansow O. A., Junhans R. P.: Ann. Intern. Med. 116, 148 (1992).
39. Roth T., Tang W., Eisenbrand G.: Anticancer Drug Des. 10, 655 (1995).
40. Rink S. M., Yarema K. J., Solomon M. S., Paige L. A., Tadayoni-Rebek B. M., Essigmann J. M., Croy R. G.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93, 15063 (1996).
41. Rigaudy R., Garbay-Jaureguiberry Ch., Jacquemin-Sablon A., Le Pecq J.-B., Roques B. P.: Int. J. Pept. Protein Res. 30, 347 (1987).
42. Czerwinski G., Tarasova N. I., Michejda J.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95, 11520 (1998).
43. Alumets J., Falkmer S., Grimelius L., Hakanson R., Lundberg O., Sundler F., Wilander B.: Acta Pathol. Microbiol. Scand. 88, 103 (1980).
44. Davis W. G., Torney W. C., Kelaney C. W.: Gut 20, 865 (1980).
45. Roth K. A., Barchas J. D.: Cancer 57, 769 (1985).
46. Rigaudy P., Charcosset J.-Y., Garbay-Jaureguiberry Ch., Jacquemin-Sablon A., Roques B. P.: Cancer Res. 49, 1836 (1989).
47. Devraj R., Barret J. F., Fernandez J. A., Katzenellenbogen J. A., Cuzhman J.: J. Med. Chem. 38, 3367 (1996).
48. Debarre A., Oberlin R., Roques B. P., Borgna J.-L., Rocheford H., Le Pecq J.-B., Jacquemin-Sablon A.: J. Med. Chem. 28, 752 (1985).
49. Honda T., Kato M., Inoue M., Shimamoto T., Shima K., Nakanishi T., Yoshida T., Noguchi T.: J. Med. Chem. 31, 1295 (1988).
50. Gal D., MacDonald P. C., Porter J., Simpson E. R.: Int. J. Cancer 28, 315 (1981).
51. Samadi-Baboli M., Favre G., Bernadou J., Berg D., Soula G.: Biochem. Pharmacol. 40, 203 (1980).
52. Favre G.: C. R. Seances Soc. Biol. Fil. 186, 73 (1992).
53. Kratz F., Beyer U., Collery P., Lechenault F., Cazabat A., Schumacher P., Falken U., Unger C.: Biol. Pharm. Bull. 21, 56 (1998).
54. Sinn H., Schrenk H. H., Friedrich A., Schilling U., Maier-Borst W.: Int. J. Rad. Appl. Instrum. 17, 819 (1990).
55. Bieler C. A., Stiborová M., Breuer A., Sinn H., Schrenk H.-H., Frei E.: 7th Internat. Symposium on Molecular Aspects of Chemotherapy, Gdańsk 1999, Abstract str. 49.
56. Frei E., Bieler C. A., Stiborová M., Breuer A., Wiessler M., Sinn H.: Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 41, 765 (2000).

M. Stiborová^a and E. Frei^b (^aDepartment of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague, ^bDepartment of Molecular Toxicology, German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany): **Targeting of Ellipticine Drugs on Tumor Cells**

Ellipticines are potent antitumor agents whose mechanism of action is considered to be based mainly on DNA intercalation and/or inhibition of topoisomerase II. Targeting of the ellipticine drugs specifically on tumor cells has been the goal of many studies. A survey of such targeting of ellipticines on tumor cells and definition of the structural requirements for receptor-targeted drugs are given in the present article. Targeted cytotoxic drugs consisting of heptagastrin, modified enkephalin, estradiol, saccharides, lipoproteins and human serum albumin linked to ellipticines, designed and prepared by many authors, are shown and their efficiencies in tumors are discussed.

JAKON (*Smallanthus sonchifolius*) A MAKÁ (*Lepidium meyenii*), TRADIČNÍ ANDSKÉ PLODINY JAKO NOVÉ FUNKČNÍ POTRAVINY NA EVROPSKÉM TRHU

KATEŘINA VALENTOVÁ^a, JAN FRČEK^b
a JITKA ULRICOVÁ^a

^aÚstav lékařské chemie a biochemie, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc, ^bVýzkumný ústav bramborářský, s.r.o., Dobrovského 2366, 580 01 Havlíčkův Brod
e-mail: dankovak@seznam.cz, frcek@vubhb.cz

Došlo dne 13.VII.2001

Klíčová slova: jakon, maka, funkční potravina, obsahové látky, biologická aktivita.

Obsah

1. Úvod
2. Botanický popis, historie, rozšíření a pěstování
3. Chemické složení a biologické účinky komponent
4. Využití v dietě a tradičním léčitelství
5. Závěr

1. Úvod

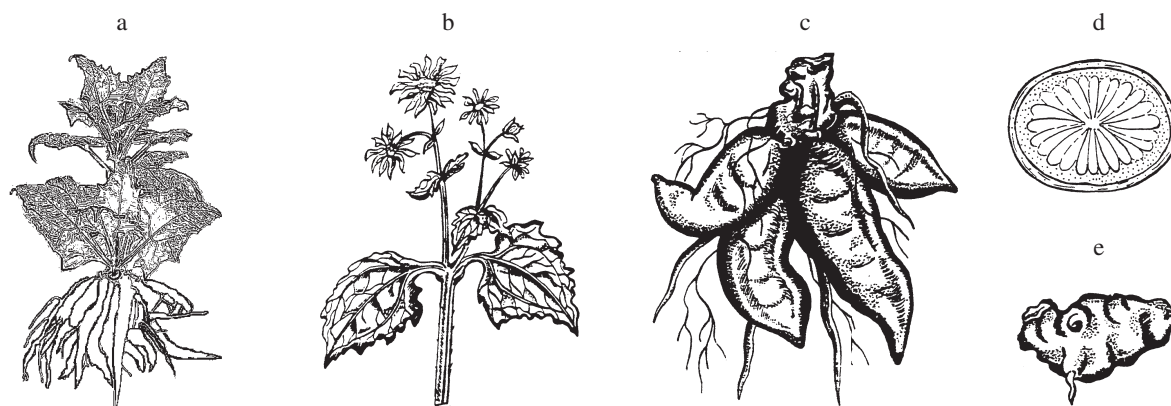
Optimálním složením diety lze preventivně předcházet mnohým chronickým onemocněním. Již klasickými příklady jsou ovlivnění hladiny cholesterolu v krvi, regulace a kontrola hladiny glukosy v krvi, snížení rizikových faktorů vzniku aterosklerózy a cukrovky, dietní substituce estrogenních hormonů v menopauze, ovlivnění průběhu osteoartritidy, prevence osteoporózy a nádorových onemocnění trávicího traktu, příznivý účinek na průběh některých neurologických onemocnění, zlepšení imunitní ochrany organismu, snížení toxických účinků nežádoucích složek potravy a toxických látek v životním prostředí. Produkty z rostlin, které svými účinky působí

pozitivně na lidský organismus, lze rozdělit na: i) funkční potraviny a ii) potravní doplňky (nutraceutika), tj. koncentrované, chemicky charakterizované a standardizované směsi látek získaných z rostlin, např. rostlinné extrakty. U všech potravinových produktů, které vykazují prokazatelný fyziologický efekt, je za jejich účinek zodpovědná určitá skupina látek, jako např. biogenní prvky, flavonoidy, fytosteroly, polysacharidy (včetně vlákniny), rozvětvené β -D-glukany, polynenasycené mastné kyseliny a další komponenty, u nichž byly prokázány pozitivní biologické účinky.

Zdravotní stav naší populace je takový, že v oblasti prevence je žádoucí nabídku trhu rozšiřovat o cenově dostupné, fyziologicky účinně působící a bezpečné funkční potraviny a potravní doplňky cíleně určené některým rizikovým skupinám populace a seniorům. Je zajímavé, že mnohé plodiny pocházející z oblasti And, na rozdíl od brambor a kukuřice, nejsou v Evropě téměř známy, přitom řada z nich po staletí pomáhala tamní populaci přežít v náročných klimatických podmínkách¹. V Andách se pěstují převážně hlíznaté a kořenové plodiny. Kromě několika druhů bramboru, *Solanum tuberosum*, *S. andigenum*, *S. ajanhuiri*, *S. stenotomum*, *S. gonocalyx*, *S. phureja*², také šťavel hlíznatý (*Oxalis tuberosa*), lichořeřišnice hlíznatá (*Tropaeolum tuberosum*), achira (*Canna edulis*), ahipa (*Pachyrhizus ahipa*), arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*), melok hlíznatý (*Ullucus tuberosus*), jakon (*Smallanthus sonchifolius*) a maka (*Lepidium meyenii*)³. Tento článek se zabývá posledními dvěma uvedenými plodinami, jakonem a makou, které lze úspěšně pěstovat v České republice. Jakon (*S. sonchifolius*, Asteraceae (Compositae)) je rostlina příbuzná topinamburu (*Helianthus tuberosus*). Maka (*L. meyenii*, Brassicaceae) je příbuzná řepě seté (*L. sativum*) a etnofarmakologie je nazývána peruánským ženšenem.

2. Botanický popis, historie, rozšíření a pěstování

Jakon (obr. 1) a jemu příbuzné rostliny byly původně zařazeny do rodu *Polymnia* (Asteraceae, Heliantheae, Melam-



Obr. 1. Jakon (*Smallanthus sonchifolius*); a – celkový vzhled, b – nadzemní část, c – podzemní hlízy, d – řez kořenovou hlízou, e – kaudex

Tabulka I

Další druhy *Smallanthus* podle H. Robinsona (1978), jejich habitus, výška, rozšíření⁹ a somatický počet chromosomů³

Druh	Habitus	Výška	Rozšíření	Chromosomy
<i>S. apus</i> (Blake)			velmi málo známý mexický druh	32
<i>S. connatus</i> (Spreng.)	jednoletá bylina	do 2 m, vytváří jedlé hlízy	velmi rozšířený – Brazílie, Paraguay, Uruguay, východní Argentina	32
<i>S. fruticosus</i> (Benth.)	keř nebo strom	do 12 m	Kolumbie, Ekvádor, severní Peru	>50
<i>S. glabratus</i> (DC.)	keř nebo strom	do 8 m	Peru, Ekvádor, Chile	
<i>S. jelksii</i> (Hieron.)	keř nebo strom	do 8 m	Peru	58
<i>S. latisquamus</i> (Blake)	bylina	do 3 m	Kostarika	
<i>S. lundellii</i>	bylina	do 1 m	Guatemala	
<i>S. macroscyphus</i> (Baker ex. Martius) A. Grau	vytrvalá bylina	do 3 m	Bolivie, severozápadní Argentina	32
<i>S. maculatus</i> (Cav.)	hrubý keř	do 5 m	Mexiko, Guatemala, Honduras, Salvador, Nicaragua, Kostarika	32,68
<i>S. macvaughii</i> (Wells)	bylina	do 5 m	Mexiko	
<i>S. meridensis</i> (Steierm.)	bylina se stonky	do 3 m	Venezuela a Kolumbie	
<i>S. microcephalus</i>	keř nebo malý strom	do 8 m	Ekvádor	54,60
<i>S. oaxacanus</i> (Sch. Bip. ex Klatt)	bylina	do 2 m	Mexiko, Guatemala a Honduras	32
<i>S. parviceps</i> (Blake)	keř nebo strom	do 8 m se stonky o Ø 15 cm	jižní Peru a severní Bolívie	58
<i>S. pyramidalis</i> (Triana)	strom	do 12 m na bázi o Ø 20 cm	Venezuela, Kolumbie a Ekvádor	60,58
<i>S. quichensis</i> (Coult.)	bylina		Kostarika, Guatemala	
<i>S. riparius</i> (H.B.K.)	bylina nebo keř	do 4 m	široce rozšířený druh od jižního Mexika po severní Bolívii	30,32
<i>S. siegesbeckius</i> (DC.)	vytrvalá bylina	do 5 m, mnoho hlíznatých kořenů podobných jakonu	Peru, Bolívie, Brazílie a Paraguay	
<i>S. suffruticosus</i> (Baker)	keř nebo bylina	do 2 m	nížiny Venezuelské Amazonie	
<i>S. uvedalius</i> (L.) (Mackenzie)	vytrvalá bylina	do 3 m	rozšířený druh na východě USA, od New Yorku po Floridu a Texas	32

podinae)³⁻⁸, přestože už v roce 1933 byl navrhován rod *Smallanthus* (Asteraceae, Heliantheae), který v roce 1978 znovu objevil Robinson a zařadil do něj 21 druhů⁹. Toto nové zařazení, *Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.), se dnes všeobecně používá jako primární, starší název *Polymnia sonchifolia* (Poepp. & Endl.) se považuje za synonymum^{3,10}, je možné se setkat také s názvem *Polymnia edulis*¹¹. Přehled dalších 20 příbuzných (planých) druhů rodu *Smallanthus*, z nichž některé vytváří keře a menší stromy, je uveden v tab. I (cit.⁹). Pouze *S. connatus*, *S. macroscyphus*, *S. riparius*, *S. meridensis*, *S. suffruticosus* a *S. siegesbeckius* s přihlédnutím ke geografickému rozložení, růstovému habitu a morfologii nadzemních částí, jsou blízce příbuzné druhy k *S. sonchifolius*³. Jakon je vytrvalá rostlina, vytvářející shluk více než dvaceti¹¹ velkých podzemních kořenových hlíz (obr. 1c, d) o hmotnosti 100–500 g, mimořádně i více než kilogram^{5,12}. Hlízy jsou podobné hlízám jiřin^{5,7,8}. Jejich tvar a velikost závisí na konkrétním kultivaru. Kořenové hlízy jsou jedlé, na povrchu jsou kryté tenkou bezbarvou slupkou, která na vzduchu rychle tmavne. Pod slupkou se nachází korová vrstva slabě pryskyřičnaté chuti a pod ní jemná dužina sklovitého vzhledu, bíle až oranžově zbarvená, jemné ovocné chuti¹². Celá rostlina je

výrazně citlivější na zmrznutí, než je tomu u jiřin (*Dahlia*), proto je v našich klimatických podmínkách vymezeno její pěstování od výsadby do sklizně na mnohem kratší vegetační období oproti zemi jejího původu¹³. Mimo hlízy kořenové má jakon také jedlé hlízy stonkové, tzv. kaudexy (obr. 1e). Kaudexy slouží k vegetativnímu (jedinému možnému, schopnost pohlavního rozmnožování rostlina ztratila³) rozmnožování této rostliny¹², pomocí kterého je rovněž možné vhodně selektovat odrůdy s největšími výnosy a nejlepšími vlastnostmi z hlediska pěstování. Nadzemní část rostliny je na obr. 1b. Stonky mohou dosahovat až 2 metrů výšky, jsou hustě olistěné tmavozelenými listy, které jsou ochlupené a zbarvené do fialova. Květenství jsou drobné úbory, žluté nebo oranžové, asi 3 cm v průměru, vyrůstající v latách na vrcholu stonku⁵. Tvoří oba typy květů – oboupohlavní květy ve střední části květenství a jazykovité samičí květy po obvodu. Produkce květů je u jakonu poměrně omezena, více než u planě rostoucích druhů rodu *Smallanthus*. Plody jsou drobné, asi 2 mm velké černé nažky. Somatický počet chromosomů u jakonu je dle autorů¹⁴ $2n = 60$, což je v souladu s cytologickými analýzami našeho klonového materiálu. Již ve velmi raných vývojových stadiích andští zemědělci poznali vlastnosti jakonu

Tabulka II

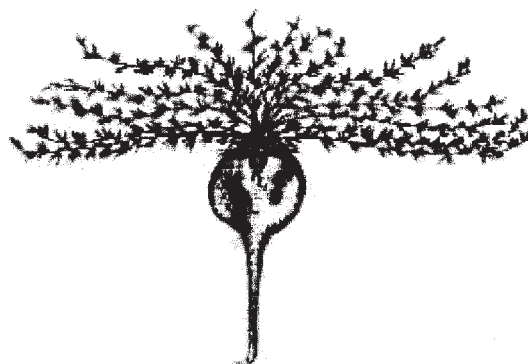
Druhy *Lepidium* s výskytem v Peru¹⁸ užívané v lidovém léčitelství¹⁹

Druh	Habitus	Nadmořská výška [m]	Lokalita ^a
<i>L. abronatifolium</i> (Turc.)	bylina	2000–2500	JU, LI
<i>L. bipinnatifidum</i> (Desv.)	bylina ¹⁹	2500–4500	AN, AR, CA, CU, HU, LI, LL, PU
<i>L. chichicara</i> (Desv.)	bylina ¹⁹	500–3000	AP, AR, AY, CA, LI, PU
<i>L. cyclocarpum</i> (Thell.)	keř	500–1000	AR, LI
<i>L. depressum</i> (Thell.)	bylina	4000–4500	JU
<i>L. kalenbornii</i> (Hitch.)	bylina ¹⁹	3000–4500	AY (endemit)
<i>L. meyenii</i> (Walp.)	bylina ¹⁹	4000–4500	MO, PU (kulturní plodina)
<i>L. peruvianum</i> (Chacón)	bylina	4000–4500	JU, PA
<i>L. pubescens</i> (Desv.)	bylina	0–500	LI
<i>L. raimondii</i> (Schulz)	bylina	0–500	CA, LL
<i>L. virginicum</i> (Hitch.)	bylina	0–1500	CA, LI, LL, MO, PI (introdukce)
<i>L. weddellii</i>	bylina	0–500	LI

^a AN = Ancash, AP = Apurimac, AR = Arequipa, AY = Ayacucho, CA = Cajamarca, CU = Cuzco, HU = Huánuco, JU = Junín, LI = Lima, LL = La Libertad, PA = Pasco, MO = Moquegua, PI = Piura, PU = Puno

a přeměnili tuto plodinu z plané na kulturní. Jakon byl nalezen již v pohřebištích z dob před Inků². V pobřežním archeologickém nalezišti Nazca (500–1200 n. l.) byla objevena vůbec nejstarší zobrazení jakonu na textiliích a na keramice³. První písemná zmínka o jakonu pochází z roku 1653 od kronikáře Padre Bernabé Cobo¹¹. V Andách se jakon pěstuje v nadmořských výškách od 880 do 3500 m. Je rozšířen od Venezuely až po severozápadní Argentinu¹¹. Většinou je pěstováno jen několik rostlin pro potřebu rodiny³. Z And se jakon dostal v osmdesátých letech minulého století přes Nový Zéland až do Japonska⁸. Jeho pěstování bylo také úspěšně zavedeno v Itálii, Německu, Francii a v USA, ale zatím nedosáhlo významnějšího rozšíření. Zejména v Itálii se hlízy jakonu používají k výrobě alkoholu a inulinu¹¹. Do České republiky byla tato plodina poprvé zavedena v roce 1993 ve formě kaudexů pocházejících z Nového Zélandu^{5,8}. Bylo zjištěno, že jakon je rostlina s neutrální reakcí na délku dne, schopná se dobře přizpůsobit sezónním výkyvům počasí, snášející dobře sucho a chlad, bez zvláštních nároků na půdu. V podmínkách Vysočiny bez možnosti zavlažování je možno dosáhnout výnosu 40 t/ha kořenových hlíz, 10 t/ha kaudexů jako sadbového materiálu a minimálně 20 t/ha nadzemní hmoty. Rostlina je citlivá vůči mrazu, noční teploty těsně nad bodem mrazu ještě úspěšně snáší⁸. Sklizeň se provádí po objevení se květenství na vrcholech stonků nebo příchodu prvních podzemních mrazů. Kořenové hlízy i kaudexy lze uchovávat v temperovaných skladech do května příštího roku.

Rod *Lepidium* patří do čeledi Brassicaceae (Cruciferae), ve které jsou i další plodiny jako např. řepka, zelí, kapusta, ředkev, hořčice a která je rozšířena po všech kontinentech¹⁵. Pochází zřejmě ze Středomoří, do Ameriky a Austrálie se pravděpodobně dostal v období třetího až čtvrtého tisíciletí př. n. l. *Lepidium* má přibližně 175 druhů, z nichž některé jsou zeleninou, např. řeřicha setá (*L. sativum*). Přehled druhů rodu *Lepidium* s výskytem v Peru¹⁶ a užívaných v lidovém léčitelství¹⁷ je v tab. II. Řeřicha – maka (*L. meyenii* Walpers, obr. 2) je rozšířena po celé Jižní Americe a je pěstována jako škrobnatá plodina. *L. peruvianum* Chacón se vyskytuje pouze v Peru^{18,19}. Nadzemní část *L. meyenii* tvoří růžici 12–20 listů podobně jako

Obr. 2. Maka (*Lepidium meyenii*)

u ředkve, hlavní stonek je redukován, spodní část se rozšiřuje ve skladovací orgán podobný tuřinu^{1,18}. Tento orgán je zduřinatělý hypokotyl a je současně hlavním ekonomickým produktem řeřichy maka. Má různé odstíny od nažloutlé až po hnědočervenou (Peruánci rozeznávají 4 odrůdy, krémově žlutou, narůžovělou, červenou a černou¹), je 10–14 cm dlouhý a 3–5 cm široký, tvrdé konzistence¹⁸. Maka je jednoletá rostlina, schopná za vhodných klimatických podmínek dokončit během jediného roku svůj celý vegetační cyklus a vyprodukovat semena, což je jediný možný způsob jejího rozmnožování. Semena nemají periodu dormance, vyklíčí za 5–7 dní při 25 °C a vhodné vláze. Jedna rostlina je schopna vyprodukovat kolem 14 g semen¹⁵. Rozmnožuje se zřejmě samoopylením. Základní genomický počet chromosomů je u řeřich $x = 8$. Maka je octoploid s $2n = 8x = 64$ chromosomy¹⁹. Přímí předchůdci *L. meyenii* nejsou známi, je však jisté, že to není žádný ze tří hlavních planých druhů rodu *Lepidium* rozšířených v Andách tedy *L. bipinnatifidum*, *L. kalenbornii* ani *L. chichicara*. Pěstovaná maka (*L. meyenii*) je také jediným druhem tohoto rodu, který produkuje hlíznaté kořeny²⁰. První zemědělci a pastevci žili v Andách již 2000 let př. n. l. a zdá se, že maka byla domestikována už dlouho před začátkem říše Inků. Primitivní

Tabulka III

Obsah látek v hlízách, listech a stoncích jakonu^{3,7,24}, v hlízách topinamburu²⁵, v sušených hypokotylech maky²³ a v ředkvi²⁶

Rostlinný orgán		Jakon			Topinambur ²⁵ hlíza	Maka ²³ hypokotyl	Ředkev ²⁶ hypokotyl
		hlíza	list ⁸	stonek ⁸			
Voda	[%]	93–70 ³	10,47		80	10,4 ^c	88,8
Proteiny		0,4–2,0 ³	21,48 ^a	9,73 ^a	10–15 ^b	10,2 ^c	1,9
Sacharidy		12,58			60–76 ^b	59,0 ^c	6,6
Tuky		0,1–0,3 ³	4,2	1,98	1 ^b	2,2 ^c	
Popel		0,3–2,0 ³	12,52	9,60	5 ^b	4,9 ^c	1,2
Vláknina		0,3–1,7 ³	11,63	23,82	4–6 ^b	8,5 ^c	
Vápník	[mg/100 g]	23 ³	1805	967	23	150 ^c	1,2
Fosfor		21 ³	543	415	99		0,7
Železo		0,3 ³	10,82	7,29	3,4	16,6 ^c	0,02
Měď		0,963 ⁷	<0,5	<0,5		5,9 ^c	
Mangan		0,541 ⁷	3,067	<0,5		0,8 ^c	
Zinek		0,674 ⁷	6,20	2,93	stopy	3,8 ^c	
Retinol		10 ³					
Thiamin		0,01 ³				0,28 ^{16,c}	0,05
Askorbát		13,10 ³			stopy	8,00 ^{16,c}	20,0
Karoten		0,02 ³					–
Riboflavin		0,11 ³			stopy	0,65 ^{16,c}	0,05
Niacin		0,34 ³			stopy		0,30

^a Obsah N-látek, ^b obsah v sušině, ^c obsah v sušeném hypokotylu

Tabulka IV

Obsah sacharidů v hlíze jakonu⁶

Složka ^a	Zastoupení [mg.g ⁻¹ sušiny]
Fruktosa	350,1±42,0
Glukosa	158,3±28,6
Sacharosa	74,5±19,0
GF ₂	60,1±12,6
GF ₃	47,4±8,2
GF ₄	33,6±9,3
GF ₅	20,6±5,2
GF ₆	15,8±4,0
GF ₇	12,7±4,0
GF ₈	9,6±7,2
GF ₉	6,6±2,3
Inulin	13,5±0,4

^a G = glukosa, F = fruktosa, GF_n = glukosylfruktosa, n je stupeň polymerizace

kultivary maky byly nalezeny v archeologických nalezištích z doby kolem 1600 let př. n. l. (cit.²). Kupodivu se však maka neobjevuje na staré peruánské keramice, tak bohaté vyobrazeními zemědělských plodin¹. Znalost této plodiny a jejích účinků se předávala z generace na generaci. V období španělské kolonizace domorodci dokonce maky používali jako pladla¹⁸. Přestože je maka adaptována na vysoké nadmořské výšky a extrémně nízké teploty (při nižších teplotách dokonce rychleji roste¹⁹), je možné ji s úspěchem přesadit na peruánské pobřeží¹⁸. Je to rostlina s neutrální reakcí na délku dne^{15,19}, lze

ji úspěšně pěstovat i mimo přirozená stanoviště¹⁵. V loňském roce se podařilo vypěstovat hypokotyle maky i v ČR. Dosud však není známo, jak se změna podmínek pěstování odrazí na složení obsahových látek. Někteří autoři²¹ se domnívají, že právě náročné životní podmínky dávají mace její sílu a účinnost. V nižších nadmořských výškách, jako např. v Německu, maka dokonce netvoří hypokotyle²¹. V ČR maka hypokotyle vytvořila pouze na poli, ve skleníku nikoli. Zdá se, že pro tvorbu hypokotylů je chladné klima důležité. Na rozdíl od praxe uplatňované při pěstování řechy maky v Peru²², prováděli jsme individuální výsevy semen klonů maky a předpěstování mladých rostlin ve skleníkových podmínkách s jejich následnou výsadbou do polních podmínek.

3. Chemické složení a biologické účinky komponent

Základní chemické složení rostlinných částí jakonu a sušených hypokotylů maky²³ (čerstvá maka obsahuje až 80 % vody, její složení nebylo v literatuře nalezeno) uvádí tab. III. Složení jakonu publikované v literatuře^{3,7,24} se různí. V tab. III je pro srovnání uveden obsah látek v topinamburu (*Helianthus tuberosus*)²⁵ a v ředkvi seté (*Raphanus sativus*)²⁶.

Hlízy obsahují jako zásobní látku inulin a jiné fruktany s nízkým podílem glukosy. Struktura oligofruktanů je typu inulinu, tj. β-1,2 vazbou spojené fruktofuranosové jednotky zakončené terminální sacharosou (viz tab. IV) stejně jako v jiných rostlinách čeledi Asteraceae, jako je např. topinambur²⁷. Obdobné fruktany o nízkém stupni polymerizace byly používány jako náhražky sacharosy a jsou považovány za nízkooenergetické. Mají příznivý vliv na lidskou střevní flóru

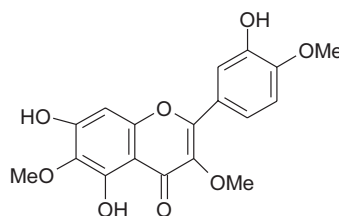
centaureidin (XII) (4,5,7-trihydroxy-3,6-dimethoxy-flavon)⁴⁴. Seskviterpenlaktony se zdají být chemotaxonomickým znakem pro čeleď Asteraceae. V rostlinách této čeledi jsou zastoupeny poměrně pravidelně a vykazují výraznou biologickou aktivitu, např. artemisin a příbuzné seskviterpenlaktony z *Artemisia annua* vykazují aktivitu antimalarickou⁴⁵ a cytotoxickou vůči buňkám kostní dřeně a nádorovým⁴⁶, repin z *Acroptilon repens* je toxický vůči embryonálním senzoryckým neuronům⁴⁷. Cytotoxické vůči nádorovým buňkám jsou také hypocretenolidy z *Leotodon hispidus*⁴⁸. Seskviterpenlaktony typu germacranu, tedy příbuzné těm obsaženým v jakonu, byly mezi jinými látkami (flavonoidy, kumariny, fenolickými kyselinami, triterpenoidy, steroidy a seskviterpenlaktony typu gaianu) izolovány i z pampelišky (*Taraxacum officinale* Web.), která je tradičně používána pro své choleretické, diuretické a protizánětlivé účinky.

V hypokotylech *L. meyeri* z mastných kyselin převažují kyseliny linoleová, palmitová a olejová, z aminokyselin lysin a arginin⁴⁹. V hypokotylech maky byly zjištěny také mnohé stopové prvky, Mn, Cu, Sn, Al, Zn, Bi, dále taniny, saponiny, ale především zde byly nalezeny látky alkaloidového charakteru nazvané makain 1, 2, 3 a 4 (cit.^{18,23}). Tyto látky, strukturně necharakterizované, se nacházely v acetonovém, etherovém a ethanolickém extraktu. Chacón de Popovici¹⁸ ze závěrů svých experimentů (viz níže) předpokládá, že právě tyto alkaloidy jsou účinnou složkou maky. V semenech příbuzné řeřichy seté (*L. sativum*) se vyskytuje alkaloid lepidin XIII. Autoři¹⁵ se domnívají, že účinnou složkou maky jsou látky povahy aromatických isothiokyanátů, konkrétně benzyliisothiokyanát a 4-methoxybenzyliisothiokyanát nebo prostaglandiny a steroidy. Aromatické isothiokyanáty se vyskytují v lichořeřišnici hlízkaté (*Tropaeolum tuberosum*) zvané mashua, která má pověst antifrodiziaka a kontraceptiva u mužů a údajně zvyšuje plodnost u žen⁵⁰. Její hypokotyle mají velmi výraznou nepříjemnou vůni¹⁵.

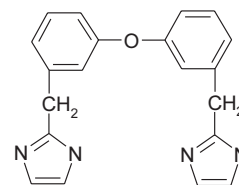
Již zmíněná mace blízké příbuzná rostlina, řeřicha setá (*L. sativum*), je zajímavým zdrojem kyseliny askorbové (52 mg ve 100 g hmoty), β-karotenu, vitaminů B₁ a K. Její typickou kořenitou chuť způsobují glykosidy hořčičného oleje, odvozené ze sirných etherických olejů, zvl. glykotropaeolinu a benzyliisothiokyanátu. Řeřicha setá zlepšuje trávení. Jiná evropská příbuzná maky, ředkev setá (*Raphanus sativus* var. *nigra*), obsahuje mimo jiné glukobrassicin (3-indoyl-methylglukosinolát), isothiokyanáty a tradičně se používá jako choleretikum, cholagogum, při onemocnění bronchů a na popáleniny^{51,52}.

4. Využití v dietě a tradičním léčitelství

Na místních trzích v Andách je jakon klasifikován jako ovoce a prodáván společně s jablky, avokády, ananasy a nikoli společně s brambory či kořenovou zeleninou, jak bychom mohli očekávat. Jeho hlízy mají příjemně nasládlou chuť, jsou křupavé a většinou se vystavují expozici na slunci, kdy dochází ke zvýšení cukernatosti. Konzumují se po oloupání většinou v ovocných salátech v kombinaci např. s banány, pomeranči. Mohou se jíst dušené, kdy do jisté míry zachovávají svou křehkost. Z hlíz lze vymačkat osvěžující džus či vyrobit koncentrát vhodný jako sladidlo pro diabetiky³. Je možné je vařit, smažit či jinak upravovat^{5,8,12}. Jako zeleninu lze použít i stonek mladých rostlin. Hlavní stonek se používá



XII



XIII

podobně jako celer². V Japonsku se hlízy jakonu zpracovávají do džusů, pečiva, fermentované formy, lyofilizovaných prášků a dřeně⁵³. Vhodnost potravin z jakonu pro přípravu diabetických pokrmů, redukčních diet a diet pro pacienty s chronickými jaterními nemocemi byla prokázána také studií provedenou ve Fakultní nemocnici v Olomouci⁵⁴. V literatuře jsou zmiňovány také diuretické účinky a hojivý účinek listů jakonu, ze kterých je připravován čaj. V Japonsku se listy a stonky jakonu míchají s čajovými lístky⁵³. Hlízy jakonu je možné využít jako krmivo pro hospodářská zvířata, lze využít i nadzemních částí, zejména pro vysoký obsah proteinů³. Hypoglykemický účinek vodného extraktu z listů jakonu byl prokázán na normálních a diabetických potkaních^{3,55}.

Maka se jí syrová nebo se upravuje v „Setonově hrnci“, což je vyhloubená jáma, do níž se naskládají rozpálené kameny. Nejčastěji se však maka volně suší na slunci. Sušená si zachovává své vlastnosti po mnoho let¹⁵. Usušené hypokotyle se vaří ve vodě nebo v mléce, vývar se používá po přidání cukru, medu, ovoce do koktejlů, ovocných či alkoholických nápojů, ovocných salátů, pro přípravu želatiny a marmelády. Domorodí léčitelé doporučují vývar při rekonvalescenci¹⁸. Ze sušené maky Indiáni připravují mouku na chléb a pečivo, případně ji praží a melou pro použití jako kávovinu¹⁵. Sušené hypokotyle se nakládají do třtinového rumu, kterému dodávají specifické aroma¹. V některých oblastech Peru se maka fermentuje a vyrábí se z ní pivo⁴⁹. Listy, podobně jako blízké příbuzná zahradní řeřicha (*L. sativum*), se konzumují v salátech². Komplementární a alternativní medicína doporučuje rozemleté hypokotyle maky jako prostředek ke zvyšování fertility, která je ve vyšších nadmořských výškách redukována, a jako afrodiziakum u lidí a zvířat. Indiánské ženy ji jedí, když chtějí otěhotnět¹. V Jižní Americe je maka nazývána peruánským nebo andským ženšenem^{1,15,56}. Dále se mace připisují adaptogenní vlastnosti, imunostimulační účinky, příznivý vliv na hormonální rovnováhu, doporučuje se v období menopauzy, působí jako anabolikum. Maka se mele na prášek a prodává se jako potravní doplněk¹. V Peru je maka nabízena ve formě mouky, lupínků, likérů aj.⁴⁹, v USA se distribuuje pod komerčními názvy Royal MacaTM (cit.⁵⁷) nebo MacaMagicTM (cit.⁵⁸), v naší republice se prodává přípravek Vimaca[®]. Seriózní výzkum ohledně jejích účinků nebyl dosud podle dostupných literárních zdrojů proveden. Afrodiziakální účinky maky se připisují zejména jejím alkaloidům, které podle Natural Health Consultants⁵⁷ působí na hypothalamo-hypofyzární systém. Producent tablet MacaMagic HERBS AMERICA⁵⁸ naproti tomu udává, že jedinečné účinky maky jsou dány především složením esenciálních aminokyselin, mastných kyselin, vitaminů a minerálů. Chacón de Popovici¹⁸ doporučuje použití

maky při malabsorbčním syndromu, karenci proteinů, jako podpůrný prostředek při chemoterapii leukemických onemocnění, AIDS, ethylismu a menopauzální anémii, uvádí se její použití k léčbě chronické polyarthritidy, při alergických záchvatech a jako laxativum⁵⁰. Tradiční použití maky se váže i k náboženským obřadům. Maka se míchala s halucinogenními látkami používanými při obětních obřadech⁵⁰. Hodnověrných farmakologických průkazů všech citovaných účinků je ve světové literatuře málo. Chacón de Popovici¹⁸ v experimentu na potkaních samicích krmených makou po dobu 6 měsíců či extraktem obsahujícím alkaloidy uvádí, že u samic došlo ke stimulaci zrání Graafových folikulů. Účinek nebyl pozorován u kontrolních zvířat ani u zvířat, kterým byla droga aplikována intraperitoneálně. U samců krmených makou se projevila zřetelná stimulace spermatogeneze. Hodnocení nutričních vlastností maky bylo studováno na bílých myších⁵⁹. Růstové křivky byly ve všech skupinách myší krmených makou statisticky významně lepší než v kontrolní skupině. Výsledky, dle autorů, demonstrují vynikající nutriční vlastnosti maky, jak je tradováno po staletí.

5. Závěr

Trendy v oblasti potravních doplňků a funkčních potravin, obsahujících biologicky aktivní přírodní látky, jsou orientovány v tomto tisíciletí na využití intaktních rostlin nebo rostlinných extraktů. Nutraceutika se postupně stanou nezbytnou součástí dietního režimu všech skupin populace v prevenci nebo podpůrné terapii některých chronických onemocnění. Vzhledem k tomu, že jakon a maku je možné pěstovat v klimatických podmínkách České republiky, předpokládáme, že by potravní doplňky z těchto plodin mohly být přínosem k prevenci a podpůrné léčbě onemocnění jako je diabetes mellitus, kardiovaskulární onemocnění, únavový syndrom a jiné. Přípravky by měly být ekonomicky dostupné široké populaci, bez nepříznivých vedlejších účinků a vyhovující platné legislativě⁶⁰. Komplexní výzkum jakonu a maky, které lze získat z domácích zdrojů, je spojen s malým ekonomickým rizikem a dobrými možnostmi rychlé aplikace výsledků.

Tato práce vznikla za finanční podpory GA ČR (grant č. 303/01/0171), Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy (Výzkumný záměr MSM 151100003) a LF UP Olomouc (interní grantový projekt č. 11501109). Autoři děkují prof. Aleši Lebedovi, DrSc. (PřF UP) a prof. Vilému Šimánkovi, DrSc. (LF UP) za cenné připomínky.

LITERATURA

1. León J.: *Econ. Bot.* 18, 122 (1964).
2. National Research Council, v knize: *Lost Crops of the Incas: Little-Known Plants of the Andes with promise for Worldwide Cultivation*. National Academy Press, Washington, D.C. 1989.
3. Grau A., Rea J., v knize: *Andean Roots and Tubers: Ahipa, Arracacha, Maca and Yacon* (Hermann M., Heller J., ed.), str. 174. IPGRI, Rome 1997.
4. Wells J. R.: *Brittonia* 17, 144 (1965).
5. Frček J., Loyková V.: *Vyz. Potrav.* 52, 131 (1997).
6. Ohyama T., Ito O., Yasuyoshi S., Ikarashi T., Minamisawa K., Kubota M., Tsukihashi T., Asami T.: *Soil Sci. Plant Nutr.* 36, 167 (1990).
7. Asami T., Kubota M., Minamisawa K., Tsukihashi T.: *Jpn. J. Soil Sci. Plant. Nutr.* 60, 122 (1989).
8. Frček J., Michl J., Pavlas J., Šupichová J.: *Plant Genetic Resources* (Annual report 1995), str. 73. University of Agriculture in Nitra, Nitra 1995.
9. Robinson H.: *Phytologia* 39, 47 (1978).
10. Yan X., Suzuki M., Ahnishi-Kameyama M., Sada Y., Nakanishi T., Nagata T. J.: *Agric. Food Chem.* 47, 4711 (1999).
11. Zardini E.: *Econ. Bot.* 45, 72 (1991).
12. Loyková V., Frček J.: *Dia Zivot* 6, 12 (1996).
13. Frček J., Loyková V.: *Alternativní a maloobjemové plodiny pro zdravou lidskou výživu*, Praha 12. listopadu 1996. Sborník VÚRV, str. 51.
14. Talledo D., Escobar C.: *Genética de las Células Somáticas de Raíces y Tuberosas Andinas. Raíces Andinas, Manual de Capacitación, CIP Lima 2000*. Fascículo 7, 1–20.
15. Quirós C. F., Aliaga R. C., v knize: *Andean Roots and Tubers: Ahipa, Arracacha, Maca and Yacon* (Hermann M., Heller J., ed.), str. 174. IPGRI, Rome 1997.
16. Brako L., Zarucchi J. L., v knize: *Catálogo de las Angiospermas y Gimnospermas del Perú. Monographs in systematic Botany*, sv. 45. Missouri Botanical Garden, Missouri 1996.
17. Girault L., v knize: *Kallawaya. Guérisseurs itinérants des Andes* (Collection Mémoires No. 107). L'Orstom, Paris 1984.
18. Chacón de Popovici G., v knize: *La importancia de Lepidium peruvianum („Maca“) en la alimentacion y salud del ser humano y animal 2,000 anos antes y desputes del Cristo y en el siglo XXI*. Servicios Gráficos „ROMERO“, Lima 1997.
19. Quirós C. F., Epperson A., Hu J. H., Holle M.: *Econ. Bot.* 50, 216 (1996).
20. Toledo J., Dehal P., Jarrin F., Hu J., Hermann M., Al-Shehbaz I., Quiros C. F.: *Ann. Bot.* 82, 525 (1998).
21. Anonym: <http://www.frozenfish.com/maca.htm>
22. Garay Canales O.: *Cultivo de la Maca*. INIA, Lima 1995.
23. Dini A., Migliuolo G., Rastrelli L., Saturnino P., Schettino O.: *Food Chem.* 49, 347 (1994).
24. Nieto C.: *Arch. Latinoam. Nutr.* 41, 213 (1991).
25. Anonym: <http://www.hort.purdue.edu>
26. Toul V., v knize: *Tržní zelinářství* (Mareček F., ed.), str. 291. SZN, Praha 1976.
27. Goto K., Fukai K., Hikida J., Nanjo F., Hara Y.: *Biosci. Biotech. Biochem.* 59, 2346 (1995).
28. Zádák Z.: <http://www.mednet.cz>
29. Mertens G.: *From Quackery to Credibility*. Financial Times Business, London 2000.
30. Asami T., Minamisawa K., Cuchija T., Kanó K., Hori I., Ojama T., Kubota M., Cukihashi T.: *Jpn. J. Soil Sci. Plant. Nutr.* 62, 621 (1991).
31. Fukai K., Ohno S., Goto K., Nanjo F., Hara Y.: *Soil Sci. Plant Nutr.* 43, 171 (1997).
32. Bencheikroun M., Amzile J., El Yachoui M., El Haloui N. E., Prevost J.: *Belg. J. Bot.* 128, 90 (1995).
33. Cukihashi T., v knize: *Kiseki no kenkô jasai jâkon*. Kōsaido Books, Tokio 1999.
34. Takasugi M., Masuda T.: *Phytochemistry* 43, 1019 (1996).

35. Kakuta H., Seki T., Hashidoko Y., Mizutani J. Biosci. Biotechnol. Biochem. 56, 1562 (1992).
36. Barrero A. F., Oltra J. E., Cerdá-Olmedo E., Ávalos J., Justicia J.: J. Nat. Prod. 64, 222 (2001).
37. Velikova M., Bankova V., Tsvetkova I., Kujumgiev A., Marcucci M. C.: Fitoterapia 71, 693 (2001).
38. Inoue A., Tamogami S., Kato H., Nakazato Y., Akiyama M., Kodama O., Akatsuka T., Hashidoko Y.: Phytochemistry 39, 845 (1995).
39. Bohlmann F., Knoll K. H., Robinson H., Kong R. M.: Phytochemistry 19, 107 (1980).
40. Tak H. Y., Fronczek F. R., Vargas D., Fischer N. H.: Spectrosc. Lett. 27, 1481 (1994).
41. Bohlmann F., Knoll K. H., Robinson H., Kong R. M.: Phytochemistry 19, 973 (1980).
42. Castro V., Jakupovic J., Dominiguez X. A.: Phytochemistry 28, 2727 (1989).
43. Bork P. M., Schmitz M. L., Kuhnt M., Esher C., Heinrich M.: FEBS Lett. 402, 85 (1997).
44. Beutler J. A., Cardellina J. H. I., Lin C. M., Hamel E., Cragg G. M., Boyd M. R.: BioMed. Chem. Lett. 3, 581 (1993).
45. Bhakuni R. S., Jain D. C., Sharma R. P., Kumar S.: Curr. Sci. 80, 35 (2001).
46. Beekman A. C., Wierenga P. K., Woerdenbag H. J., Van Uden W., Pras N., Konings A. W. T., El-Ferally F. S., Galal A. M., Wikström H. V.: Planta Med. 64, 615 (1998).
47. Stevens K. L., Riopelle R. J., Wong R. Y.: J. Nat. Prod. 53, 218 (1990).
48. Zidorn C., Stuppner H., Tienfenthaler M., Konwalinka G.: J. Nat. Prod. 62, 984 (1999).
49. Anonym: <http://www.ssc.upemm.edu>
50. Aliaga E.C., Aliaga R.C., v knize: *Guia para el cultivo, aprovechamiento y conservacion de la maca, Lepidium meyenii Walpers*. Convenio Andres Bello, Santafé de Bogotá 1998.
51. Bruneton J., v knize: *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants*. Intercept, Hampshire 1995.
52. Kresánek J., Krejča J., v knize: *Atlas léčivých rostlin a lesných plodov*. Vydavateľstvo Osveta, Martin 1977.
53. Anonym: <http://www.yaconcha.com>
54. Frček J., Psotová J., Šimánek V.: *Výživa rostlin, kvalitativní produkce a zpracovatelské využití*, MZLU Brno 29.–30.6.1999. Sborník, str. 300.
55. Aybar M. J., Sánchez Riera A. N., Grau A., Sánchez S. S.: J. Ethnopharm. 74, 125 (2001).
56. Gutierrez C.: <http://www.peruonline.net>
57. Anonym: <http://naturalhealthconsult.com/Monographs/maca.html>
58. Anonym: <http://www.macaroot.com>
59. Canales M., Aguilar J., Prada A., Marcelo A., Huaman C., Carbajal L.: Arch. Latinoam. Nutr. 50, 126 (2000).
60. Vyhláška č. 23/2001 Sb. Ministerstva zemědělství, kterou se stanoví druhy potravin určené pro zvláštní výživu a způsob jejich použití.

K. Valentová^a, J. Frček^b, and J. Ulrichová^a (^a*Institute of Medical Chemistry and Biochemistry, Faculty of Medicine, Palacky University, Olomouc*, ^b*Potato Research Institute, Havlíčkův Brod*): **Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) and Maca (*Lepidium meyenii*), Traditional Andean Crops as New Functional Foods on the European Market**

Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) and maca (*Lepidium meyenii*) are traditional crops of the original population of Peru, which are also used in traditional medicine. However, these plants are little known in Europe and Northern America, although they can be cultivated in the climatic conditions of these regions. This article is a review of their botanical aspects, their growing in the Czech Republic, composition and structure of main constituents, and biological activity. These plants are already on European market as prospective functional foods and nutraceuticals for use in certain risk groups of population.

RESVERATROL

JAN ŠMIDRKAL^a, VLADIMÍR FILIP^a,
KAREL MELZUCH^b, IRENA HANZLÍKOVÁ^b,
DANIELA BUCKIOVÁ^c a BOHDAN KRÍSA^d

^aÚstav technologie mléka a tuků, ^bÚstav kvasné chemie a bioinženýrství, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^cÚstav experimentální medicíny Akademie věd České republiky, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4,

^dKatedra botaniky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Benátská 2, 128 01 Praha 2

e-mail: Jan.Smidrkal@vscht.cz

Došlo dne: 2.XI.2000

Klíčová slova: resveratrol, pinosylvín, viniferiny, stilbeny, antioxidanty, víno

Prolog

„Soudím, že muži i ženy, kteří pravidelně pijí malé množství alkoholu, jsou méně náchylní k nemocím a mají menší úmrtnost na srdeční onemocnění a vůbec menší úmrtnost ze všech příčin než ti, kdo trvale abstinuji.“ Tato slova pronesl osmaosmdesátiletý emeritní profesor Oxfordské univerzity Sir Richard Doll roku 1991 na kongresu v australském Sydney. Jeho slova nikdo nezpochybnil, neboť právě tento gentleman, který je váženou autoritou v oboru medicíny, nezvratně prokázal souvislost kouření a rakoviny plic.

Tato slova jistě potěší tu (zřejmě značnou) část lidské populace, která je s alkoholem (ethanolem) zcela kompatibilní. Sir Richard vlastně uvedl na pravou míru slova jednoho z průkopníků tohoto oboru dietologie, Hoga Foga z filmu Limonádový Joe, který již před řadou let pronesl okřídlenou větu: „Alkohol podávaný v malých dávkách neškodí v jakémkoli množství“.

Dalším obecným důvodem, proč pít alkoholu (míněno vína) nemůže být příliš škodlivé, může být Darwinova teorie, která praví, že živé organismy se buď přizpůsobí okolním podmínkám, nebo vyhytnou. Lidstvo pije víno po tisíciletí (údajně 6000 let) a nevyhynulo. Tato myšlenka logicky dovedena do důsledků vede k závěru, že pokud se lidstvo pít vína přizpůsobilo, je abstinence vlastně škodlivá, jak je uvedeno shora.

Auťori nijak nepodceňují dietologii a rady pro zdravou výživu, ale pamatují řadu doporučení, že se má jíst to či ono, a za několik let se se stejnou jistotou tvrdilo, že tomu tak úplně není, nebo dokonce je tomu právě naopak.

Obsah

1. Úvod
2. Výskyt v přírodě
3. Chemická struktura
4. Funkce v rostlině
5. Biosyntéza resveratrolu
6. Izolace resveratrolu
7. Syntéza resveratrolu
8. Praktické využití resveratrolu v současnosti
9. Závěr

1. Úvod

Zájem o sledování výskytu resveratrolu byl podmíněn existencí tzv. „francouzského paradoxu“^{1,2}. Bylo zjištěno a statisticky dokázáno, že v určitých částech Francie byla nižší četnost úmrtí na onemocnění koronárních tepen (infarktu myokardu), a to navzdory tomu, že spotřeba tuků byla vysoká. Konzumace vína byla jedním z faktorů, kterým bylo možno vysvětlit nízkou úmrtnost na onemocnění věnčitých tepen. Tato skutečnost vedla k domněnce, že požívání vína může působit proti účinkům diety s vysokým obsahem tuků, a omezit tak možnost vzniku a rozsah onemocnění věnčitých tepen. V současné době řada pracovišť testuje biologické vlastnosti resveratrolu od antioxidačních vlastností³ a vlivu na aterosklerozu a kardiovaskulární choroby^{4–7} až po antimutagenní efekt⁸ a chemoprevenci⁹ nádorových onemocnění. V řadě případů bylo dosaženo pozoruhodných výsledků.

Komplexnější poznatky o resveratrolu byly získány v osmdesátých letech minulého století, kdy přístrojové vybavení (zejména HPLC) umožnilo sledování jeho výskytu a koncentrace ve vinné révě, *Vitis vinifera* L. (*Vitaceae*)^{10–22}. Následně byly zkoumány biologické vlastnosti resveratrolu a v řadě studií bylo prokázáno, že resveratrol jakožto polyfenol přírodního původu je biologicky aktivní, má výrazné antioxidační vlastnosti a pohlcuje volné radikály. Obecně platí, že rostlinné polyfenoly jako sloučeniny s antioxidačními vlastnostmi inhibují zhoubné nádorové bujení. Kromě toho je resveratrol patrně jednou z hlavních složek rostlinných extraktů, které jsou využívány v orientální medicíně k léčení srdečních a nádorových onemocnění.

2. Výskyt v přírodě

Resveratrol byl poprvé izolován z podzemní části kyčavice velkokvěté, *Veratrum grandiflorum* A. Gray (*Liliaceae*)²³. Resveratrol byl dále nalezen ve více než 72 rostlinných druzích, které patří systematicky do 31 rodů a 12 čeledí (je pochopitelné, že se zdokonalováním analytických metod se počty rostlinných druhů obsahujících resveratrol zvyšují). Řada těchto rostlin je běžnou součástí lidské diety, např. vinné hrozny (a z nich víno jako nápoj), řada druhů zeleniny a ořechy (např. arašídy). Poměrně bohatým a rozšířeným zdrojem res-

veratrolu jsou právě hrozny révy vinné. Střední koncentrace resveratrolu v červených vínech je cca 2–6 mg.l⁻¹, v bílých vínech je jeho koncentrace nižší, cca 0,2–0,8 mg.l⁻¹ (cit.^{19,24}).

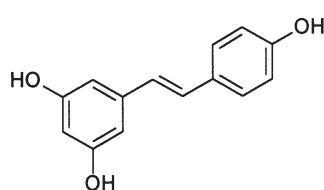
Koncentrace resveratrolu v běžně konzumovaných potravinách v České republice (stanoveno v roce 2000) je uvedena v tabulce I (cit.²⁵). Z tabulky je patrné, že množství 1 mg resveratrolu je obsaženo v 0,4 až 2,5 kg uvedených zelenin. Z hlediska obsahu resveratrolu je vhodné pro konzumaci zejména červené zelí, brokolice nebo červená řepa, neboť 0,5 kg těchto zelenin se sní spíše než 0,5 kg arašídů. Červená vína obsahují 2–6 mg.l⁻¹ resveratrolu, tedy 1 mg resveratrolu je obsažen v 0,17–0,50 l červeného vína. Optimální je patrně kombinace zeleniny a vína, což odpovídá výše uvedeným stravovacím zvykům Francouzů.

3. Chemická struktura

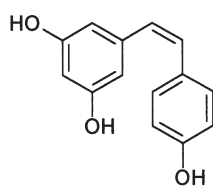
Resveratrol (triviální název) je svou strukturou 3,4',5-trihydroxystilben (*I*). Z jeho struktury je zřejmé, že mohou

existovat dva geometrické isomery, *trans-Ia* a *cis-Ib*. V rostlinném materiálu se obvykle vyskytuje směs obou isomerů, většinou převažuje *trans*-isomer. Resveratrol se vyskytuje rovněž ve formě glukosidů¹, β-glukosyloxy skupina je vázána buď v poloze 3-(triviální název piceid *II*), nebo v poloze 4'-(resveratrolosid), od obou typů je znám *trans*- i *cis*-isomer*.

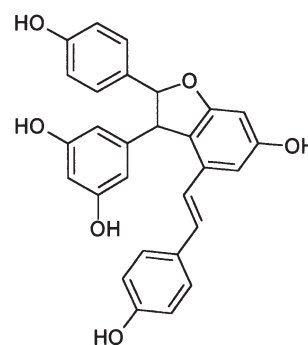
Kromě toho jsou v rostlinném materiálu přítomny oligomery (tedy přesně dehydrooligomery) resveratrolu, tzv. konstitutivní stilbeny¹, dimer resveratrolu ε-viniferin (*Ic*) a trimer α-viniferin (*Id*). Uvedené oligomery resveratrolu nejsou jediné, v poslední době byla popsána čínskými autory^{26,27} řada analogických oligomerů resveratrolu, amurensiny H (*Ie*) a G z podzemní části révy amurské, *Vitis amurensis* Rupr. (*Vitaceae*). Amurensin H je vlastně dehydro-ε-viniferin, tj. oxidační produkt ε-viniferinu. Podobně japonští autoři²⁸ izolovali z loubince trojlaločného, *Parthenocissus tricuspidata* Sieb et Zucc. (*Fabaceae*, dříve *Leguminosae*) dimer isoampelopsin F a francouzští autoři izolovali z *Cissus quadrangularis* L. (*Cissaceae*) další tři dimery, které nazvali quadrangularin A, B a C (cit.²⁹).



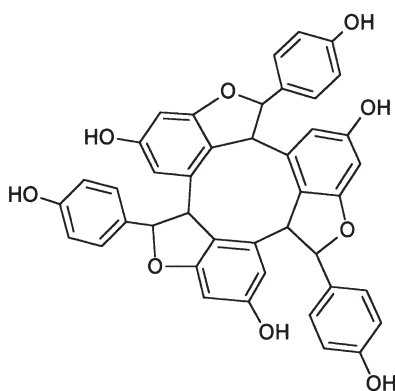
trans-resveratrol, *Ia*



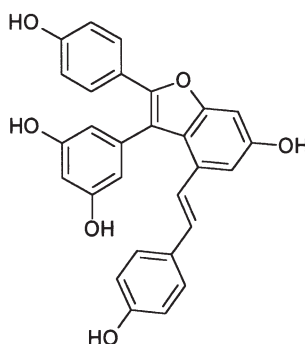
cis-resveratrol, *Ib*



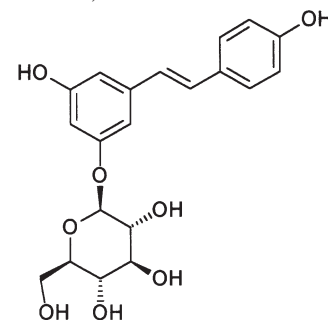
ε-viniferin, *Ic*



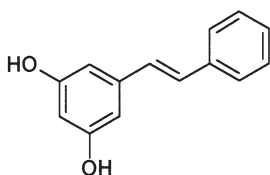
α-viniferin, *Id*



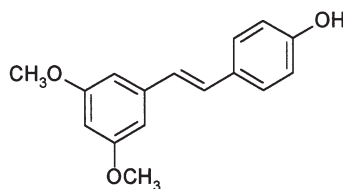
amurensin, *Ie*



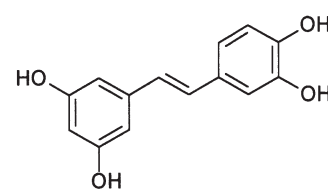
piceid, *II*



pinosylvin, *III*



pterostilben, *IV*

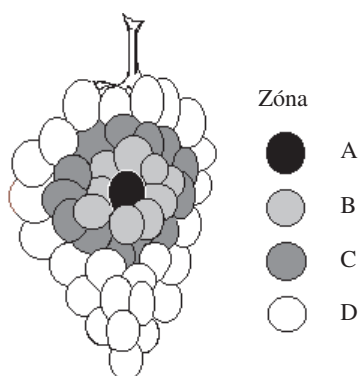


piceatannol, *VIII*

* V textu je užíván jak triviální název resveratrol, tak i systematický název 3,4',5-trihydroxystilben (*I*). Pokud není v názvu sloučeniny uvedeno, o jaký stereoisomer se jedná (citovaná literatura geometrické uspořádání neuvádí), je míněn *trans*-, tedy (*E*)-isomer.

Tabulka I
Koncentrace resveratrolu v běžných druzích potravin

Rostlina	Latinské jméno rostliny (čeleď)	Resveratrol [mg.kg ⁻¹ _{sus.}]	Sušina [%]	Resveratrol [mg.kg ⁻¹]	Množství [kg] obsahující 1 mg res- veratolu
Zelí čínské	<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>chinensis</i> (Brassicaceae)	9	5	0,5	2,2
Kapusta hlávková	<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>capitata</i> (Brassicaceae)	7	14	1,0	1,0
Kapusta růžičková	<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>gemmifera</i> (Brassicaceae)	15	17	2,6	0,4
Zelí červené	<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>capitata</i> convar. <i>rubra</i> (Brassicaceae)	15	16	2,4	0,4
Zelí bílé	<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>capitata</i> convar. <i>alba</i> (Brassicaceae)	8	7	0,6	1,8
Brokolice	<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>italica</i> (Brassicaceae)	15	12	1,8	0,6
Čekanka	<i>Cichorium intybus</i> L. var. <i>foliosum</i> (Cichoriaceae)	20	5	1,0	1,0
Petržel naťová	<i>Petroselinum hortense</i> L. (Daucaceae)	5	19	1,0	1,1
Mrkev karotka	<i>Daucus carota</i> L. (Daucaceae)	4	10	0,4	2,5
Červená řepa	<i>Beta vulgaris</i> L. (Chenopodiaceae)	8	22	1,8	0,6
Česnek	<i>Allium sativum</i> L. (Liliaceae)	2	29	0,6	1,7
Cibule žlutá	<i>Allium cepa</i> L. (Liliaceae)	17	9	1,5	0,7
Cibule červená	<i>Allium cepa</i> L. (Liliaceae)	12	9	1,1	0,9
Podzemnice olejná	<i>Arachis hypogaea</i> L. (Fabaceae)	2	94	1,9	0,5
Čajovník čínský	<i>Thea sinensis</i> L. (Theaceae)	1	94	0,9	1,1



Obr. 1. Hrozen révy vinné napadený plísní *Botrytis cinerea*

Čínští autoři připravili amurensin H (*Ie*) oxidací resveratrolu chloridem železitým²⁶. Je možné, že analogicky při izolaci těchto sloučenin z rostlin, kde jsou obvykle přítomny v katalytickém množství železité ionty, dochází k oxidaci resveratrolu na některé z výše uvedených dimerů a trimerů.

Výše uvedené dimery a trimery jsou tedy oxidační produkty resveratrolu. Otázkou však je, zda vznikají oxidací resveratrolu v rostlině (tedy jsou obsahovou látkou rostliny), nebo zda některé z nich vznikly až oxidací resveratrolu během zpracování rostlinného materiálu, a jsou to tedy artefakty.

4. Funkce v rostlině

Resveratrol lze zařadit mezi fytoalexiny, což jsou sekundární metabolity rostlin, které se začínou tvořit *de novo* nebo ve zvýšené míře jako odpověď na stres (mechanické poškození, UV záření, ozon) nebo po napadení rostliny nepatogenními

Tabulka II
Koncentrace resveratrolu ve slupkách hroznu 48 h po napadení plísní *Botrytis cinerea*

Zóna (obr. 1)	<i>Trans</i> -resveratrol [mg.kg ⁻¹]		
	Pinot	Chardonnay	Gamay
A	6	2	6
B	28	6	16
C	22	4	9
D	20	2	9

Hodnoty jsou zaokrouhleny, přesnost stanovení je cca 20 % rel.

nebo avirulentními bakteriemi, viry či houbami. Některé fytoalexiny mají antibakteriální nebo antifungální účinnost, jiné jsou pro danou infekci neúčinné; nejsou tedy ekvivalentní protilátkám, které vyšší organismy tvoří po infekci.

Fyziologická funkce resveratrolu v rostlinách není stále zcela jasná. Tvorba fytoalexinů (*trans*-resveratrolu a ϵ -viniferinu) je jedním z mechanismů rezistence buňky. Při napadení révy vinné plísní (např. *Botrytis cinerea* či *Plasmopara viticola*)^{10–15,20} nebo po expozici UV zářením^{16,17} se začínou rychle tvořit a akumulovat fytoalexiny, maximální koncentrace *trans*-resveratrolu je dosaženo po 24–96 h od expozice, poté jeho koncentrace klesá a po cca 16 dnech se ustálí na původním stavu.

Při napadení hroznu révy vinné plísní *Botrytis cinerea* lze pozorovat, jak rostlina vytváří resveratrolovou bariéru okolo napadeného místa^{1,22} (obr. 1). V místě napadení (zóna A) je koncentrace resveratrolu nízká, je možné, že plíseň rozkládá fytoalexin, jehož působení je vystavena. Maximální koncentrace resveratrolu (cca 4× vyšší než v napadeném místě) je

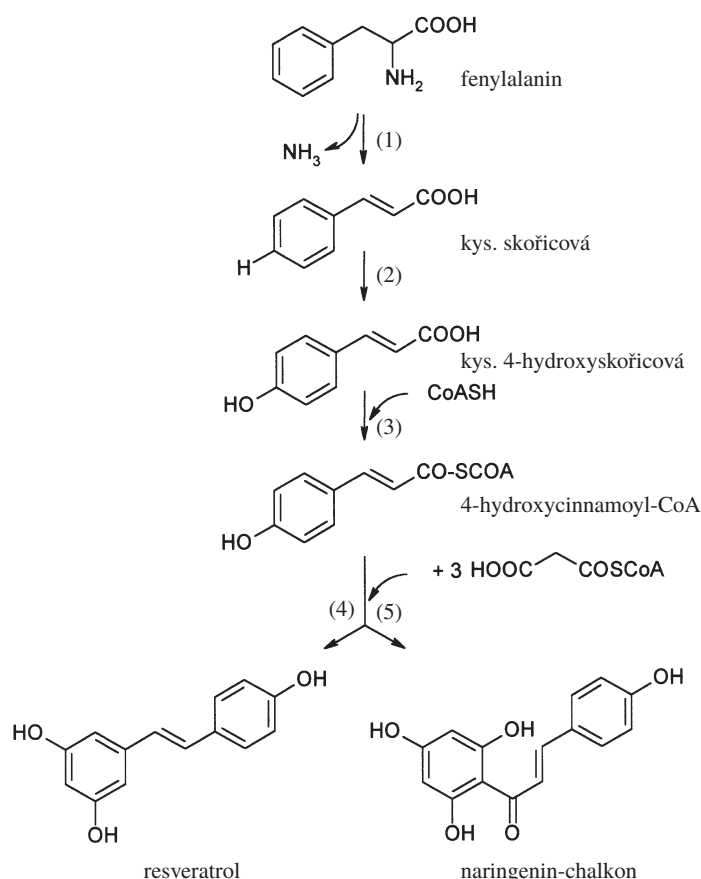


Schéma 1. Biosyntéza resveratrolu. Reakce jsou katalyzovány těmito enzymy: 1) fenylalanin amonium-lyasa (EC 4.3.1.5), systematický název: L-fenylalanin amonium-lyasa, 2) cinnamát-4-hydroxylasa (EC 1.14.13.11), systematický název: *trans*-cinnamát, NADPH:kyslík-oxidoreduktasa (4-hydroxylující), 3) 4-kumarát-CoA ligasa (AMP) (EC 6.2.1.12), systematický název: 4-kumarát: CoA ligasa(AMP), 4) trihydroxystilben synthasa, nebo resveratrol synthasa (EC 2.3.1.95), systematický název: malonyl-CoA: 4-kumaroyl-CoA, malonyl transferasa (cyklizující), 5) naringenin-chalcon synthasa, nebo chalcon synthasa (EC 2.3.1.74), systematický název: malonyl-CoA:4-kumaroyl-CoA, malonyl transferasa (cyklizující)

v sousední zóně B (nabízí se přirovnání sanitární kordon), se zvyšující se vzdáleností od centra napadení pak koncentrace zvolna klesá. Koncentrace resveratrolu v jednotlivých zónách je uvedena v tabulce II. Podobná bariéra se rovněž vytváří kolem napadeného místa listu révy vinné¹².

Je pravděpodobné, že ve zralých hroznech je syntéza *trans*-resveratrolu nebo jeho glykosidu nějakým způsobem iniciována. Kromě výše uvedených faktorů i mechanické poškození slupky bobulí indukuje i u neinfikovaných hroznů syntézu fytoalexinů, zřejmě jako preventivní ochranu před napadením plísněmi. Předpokládá se, že zdrojem *trans*-resveratrolu ve víně (jako nápoji) jsou polyfenolické sloučeniny (konstitutivní stilbeny, tedy viniferiny), extrahované ze slupek bobulí, zbytků třepin a stonků, ze kterých vzniká *trans*-resveratrol během dalších procesů.

5. Biosyntéza resveratrolu

Původním prekurzorem pro biosyntézu¹ resveratrolu (schéma 1) jsou glykosidy, ze kterých vzniká nejprve Shikimatovou cestou fenylalanin. Fenylalanin je fenylalanin amonium-ly-

sou přeměněn na kyselinu skořicovou, která je pak oxidována cinnamát-4-hydroxylasou na kyselinu 4-hydroxyskořicovou. Z této skořicové kyseliny vzniká reakcí s volným CoA za působení specifické CoA ligasy 4-hydroxycinnamoyl-CoA, ze kterého kondenzací s třemi molekulami malonyl CoA (vzniká karboxylací acetylkoenzymu A) za působení resveratrol synthasy se v řadě druhů čeledi *Vitaceae* syntetizuje resveratrol, přičemž se uvolňují čtyři molekuly oxidu uhličitého.

Rostliny čeledi *Vitaceae* mají kromě stilben synthasy k dispozici ještě jeden enzym, chalcon synthasu, která katalyzuje kondenzaci 4-hydroxycinnamoyl-CoA se třemi molekulami malonyl-CoA, při které se však uvolňují pouze tři molekuly oxidu uhličitého a jejímž produktem je naringenin-chalkon, ze kterého pak dalšími reakcemi vznikají flavonoidy. Skupina flavonoidů zahrnuje taniny a anthocyaniny, které způsobují hořkost, resp. pigmentaci slupky zralých hroznů.

Zajímavé je, že v řadě druhů borovic (např. borovice lesní, *Pinus sylvestris* L. (*Pinaceae*)) je kyselina skořicová konvertována jinou ligasou na cinnamoyl-CoA, ze kterého pak analogickým způsobem vzniká pinosylvin ((*E*)-3,5-dihydroxystilben, *III*), který, stejně jako resveratrol, působí jako fytoalexinový fungicid v jádře dřeva¹.

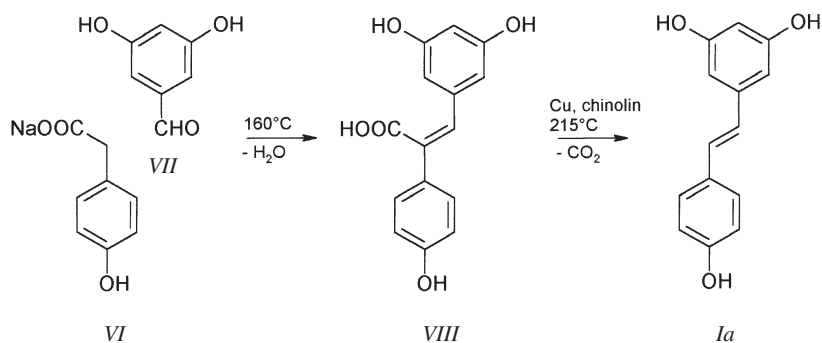


Schéma 2. Syntéza resveratrolu podle Spätha

6. Izolace resveratrolu

Jak je uvedeno v kapitole 2, koncentrace resveratrolu ve víně jako nápoji je cca 2 mg.l^{-1} , tj. 2 g.m^{-3} . I když jeho koncentrace je ve slupkách bobulí, zbytcích třepin a stoncích vyšší ($4\text{--}40 \text{ mg.kg}^{-1}$ čerstvého materiálu), jeho získání jako chemicky čistého individua je poměrně obtížné, neboť je doprovázen řadou dalších sloučenin obdobné struktury. Čistý resveratrol byl pro experimentální účely získáván izolací z rostlinného materiálu, často z rdesna kadeřavého, *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. (*Polygonaceae*)^{30,31}, nebo z peruánské *Cassia quinquangulata* Rich. (*Caesalpiniaceae*)⁹, kde z 1 kg drogy bylo získáno 30 mg resveratrolu. V současnosti se pro experimenty spíše používá resveratrolu získaného synteticky (viz další kapitola).

Resveratrol jako antioxidant je citlivý na působení vzdušného kyslíku, takže izolace z přírodního materiálu je poměrně pracná. Ostatně kauzální otázkou zůstává, proč resveratrol jako potravní doplněk z rostlinného materiálu izolovat, když je možno hrozny révy vinné nebo zeleninu konzumovat jako takové v čerstvém stavu nebo pít víno jako nápoj.

7. Syntéza resveratrolu

Takaoka²³ izoloval resveratrol (b.t. 261°C) z podzemní části kýchavice velkokvěté, *Veratrum grandiflorum* A. Gray (*Liliaceae*). Určil jej jako fenolickou sloučeninu a připravil z ní methylací resveratroltrimethylether (V, b.t. $56\text{--}57^\circ \text{C}$), který oxidací oxidem chromovým poskytl kyselinu 3,5-dimethoxybenzoovou a kyselinu 4-methoxybenzoovou. Na základě struktury těchto rozkladných produktů určil resveratrol jako 3,4',5-trihydroxystilben (I). Späth se spolupracovníky^{32–35}, který se zabýval konstitucí a syntézou přírodních stilbenů, např. pterostilbenu (4'-hydroxy-3,5-dimethoxystilbenu, IV) izolovaného z červeného santalového dřeva *Pterocarpus santalinoides* l'Herit (*Fabaceae*), připravil z pterostilbenu IV methylether (b.t. $56\text{--}57^\circ \text{C}$), který byl totožný s trimethyletherem resveratrolu (V), a tak byla ještě jednou potvrzena struktura pterostilbenu IV i struktura resveratrolu.

Späth³⁴ syntetizoval resveratrol kondenzací natrium-2-(4-hydroxyfenyl)-acetátu (VI) a 3,5-dihydroxybenzaldehydu (VII) a následnou dekarboxylací vzniklé stilbenkarboxylové kyseliny VIII (schéma 2). Obdobným způsobem syntetizoval Späth³⁵ i pinosylvin (III).

Po těchto klasických průkopnických pracích japonských

a rakouských autorů uplynulo téměř půl století, než studium působení fytoalexinů v révě vinné vyvolalo potřebu většího množství čistého resveratrolu jako substance. Izolace z rostlinného materiálu je pracná, jak bylo uvedeno výše, tímto způsobem se za vynaložení přiměřeného množství práce dá v laboratorním měřítku připravit resveratrol v množství 0,1–1,0 g. Kromě toho se jako výchozí suroviny používá poměrně exotického rostlinného materiálu. Rovněž není znám vhodný přírodní či syntetický meziprodukt, který by se dal na resveratrol snadno chemicky transformovat. Jako jediný způsob přípravy resveratrolu zbývá tedy totální syntéza.

Fytoalexiny se obvykle studují tam, kde roste vinná réva a je následně rozvinuta výroba vína jako nápoje. Je tedy pochopitelné, že první novější syntetické studie pocházejí od španělských autorů³⁶ z Barcelony (Moreno-Mañas a Pleixats), neboť Španělsko je země vína, stejně jako Francie a Itálie. Jako výchozí látky bylo použito kyseliny dehydroacetové (3-acetyl-4-hydroxy-6-methylpyran-2-on, IX), která byla převedena na orcinol (5-methylbenzen-1,3-diol, X). Orcinol (X) byl nejprve acetylován acetanhydridem na diacetylorscinol, ten pak byl následně bromován *N*-bromsukcinimidem v tetrachlormethanu na 5-brommethylbenzen-1,3-diyl-diacetát (XI). Reakcí XI s trifenyfosfinem byl připraven 3,5-diacetoxybenzyl-trifenyfosfonium-bromid (XII), z něhož reakcí s methanolem za katalýzy *p*-TsOH (podle Reimanna³⁷) připraven odpovídající dihydroxyderivát XIII, a ten Wittigovou reakcí s 4-(trimethylsilyloxy)-benzaldehydem poskytl *trans*-resveratrol (Ia) v 10 % výtěžku (schéma 3). Postup podle Moreno-Mañase a Pleixatse použili i francouzští autoři, Jeandet a spol.³⁸

Je popsána řada způsobů provedení Wittigovy reakce. Moreno-Mañas použil jako bázi fenyllithium v trojnásobném molárním přebytku v etheru (2 moly fenyllithia reagují s –OH skupinami fosfoniové soli XIII). Japonští autoři³⁹, kteří použili pro Wittigovu syntézu methoxysloučenin (3,5-dimethoxybenzaldehydu, XIV a trifenyl-4-methoxybenzyl-fosfonium-bromidu XV), zvolili jako bázi kalium-*tert*-butoxid v ekvimolárním množství v tetrahydrofuranu. Produktem Wittigovy reakce byla směs (*E*)- a (*Z*)-isomeru 3,4',5-trimethoxystilbenu (*Va* a *Vb*) v poměru 48:52, celkový výtěžek reakce byl 99 %. Směs isomerů *Va* a *Vb* byla isomerizována za katalýzy difenylsulfidem na čistý (*E*)-isomer *Va*, a ten byl demetylován bromidem boritým na *trans*-resveratrol (Ia).

Wittigovu-Hornerovu reakci pro syntézu resveratrolu aplikoval profesor Cushman se spolupracovníky⁴⁰. Jako výchozí sloučeniny použil benzyloxyderiváty. I v tomto případě vzniká

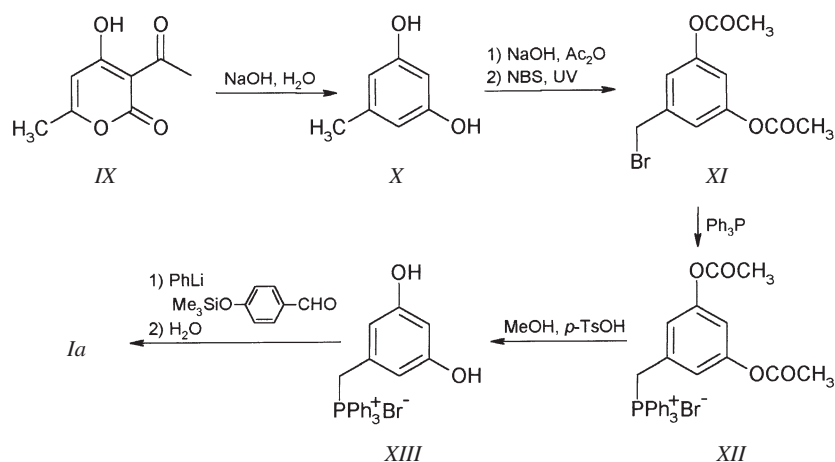


Schéma 3. Syntéza resveratrolu podle Moreno-Mañase a Pleixatse

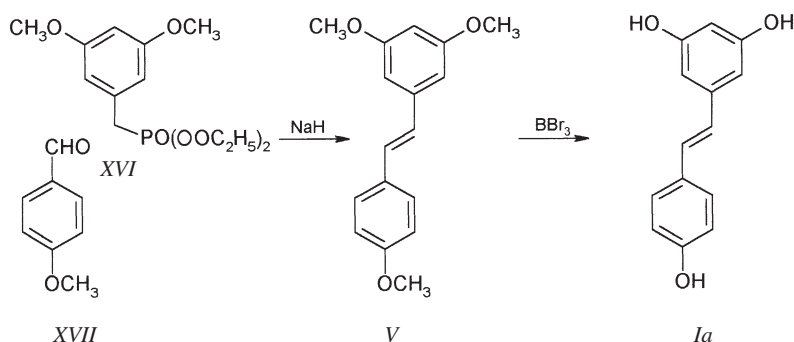


Schéma 4. Syntéza resveratrolu Wittigovou-Hornerovou reakcí

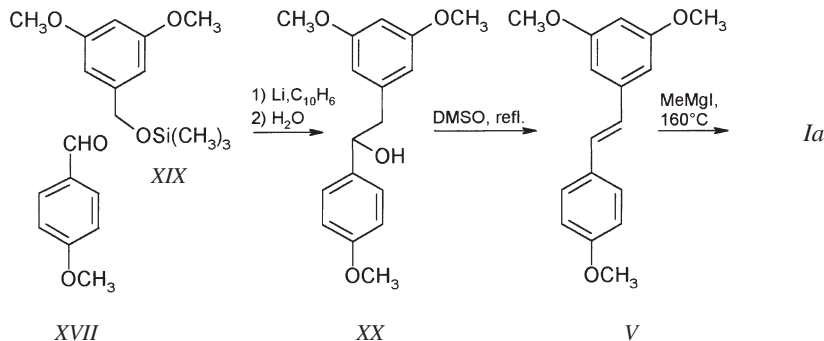


Schéma 5. Syntéza resveratrolu dle Alonsa a spol.

směs (*E*)- a (*Z*)-isomerů, izolován byl pouze (*E*)-isomer (vý-
těžek 76 %). Benzylskupiny byly odštěpeny působením chlo-
ridu hlinitého v přítomnosti dimethylanilinu a *trans*-resve-
ratrol (*Ia*) byl získán ve výtěžku 69 %. Analogicky byla
Wittigova-Hornerova metoda užita německými autory⁴¹, čín-
skými autory⁴² a českými autory⁴³ (schéma 4), kde reakcí
diethyl-3,5-dimethoxybenzylfosfonátu (*XVI*) a 4-methoxy-
benzaldehydu (*XVII*) byl připraven (*E*)-trimethylether *V*, a ten
byl demethylován bromidem boritým na *trans*-resveratrol (*Ia*).
Analogicky byl tímto způsobem připraven pinosylvin (*III*)
(cit.⁴⁴) a piceatannol (*XVIII*) (cit.⁴⁰).

Španělští autoři Alonso a spol.⁴⁵ publikovali originální
syntézu resveratrolu (schéma 5), jejímž klíčovým stupněm je
reakce (3,5-dimethoxybenzyl)-trimethylsilyletheru (*XIX*) a 4-
methoxybenzaldehydu (*XVII*) na hydroxysloučeninu (*XX*), ze
které následnou dehydratací v dimethylsulfoxidu za varu vzniká
(*E*)-3,4',5-trimethoxystilben (*V*) (vzniká pouze *E*-isomer),
a ten demethylací methylmagnesiumjodidem (molární poměr
1:20) při 100–160 °C poskytne *trans*-resveratrol (*Ia*).

Je popsána i syntéza glykosidu resveratrolu⁴⁶ (schéma 6).
Piceid, tedy (*E*)-3-(β -D-glucopyranosyloxy)-4',5-dihydroxy-
stilben (*II*) byl připraven následujícím způsobem. Wittigovou

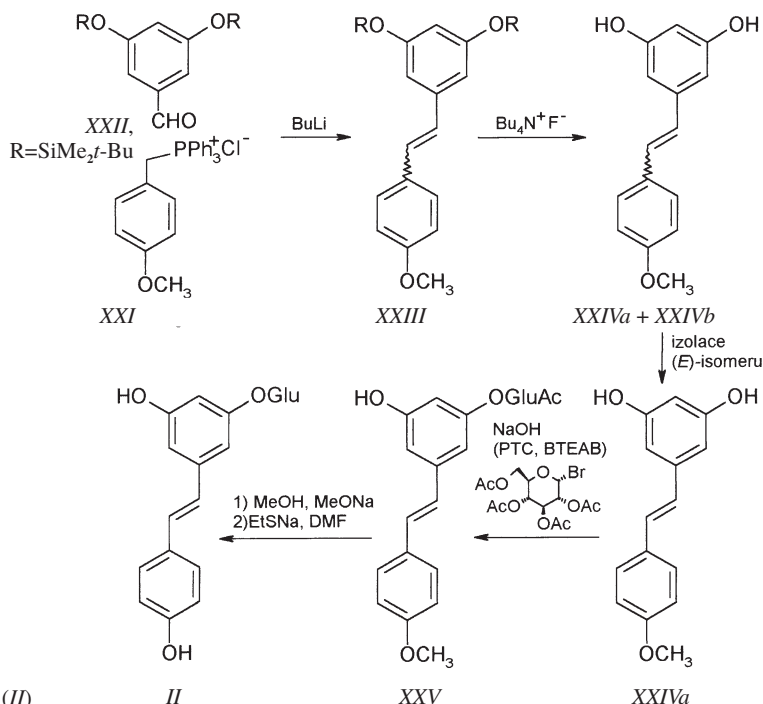


Schéma 6. Syntéza piceidu (II)

reakcí trifeny-4-methoxybenzylfosfonium-chloridu (XXI) a 3,5-bis-(*t*-butyldimethylsilyloxy)-benzaldehydu (XXII) byl získán XXIII (směs *Z/E*-isomeru v poměru 2,3:1). Desilylací XXIII tetrabutylamonium-fluoridem vznikla směs XXIVa a XXIVb, ze které byl izolován (*E*)-3,5-dihydroxy-4'-methoxystilben (XXIVa). Z dihydroxystilbenu XXIVa byla reakcí s 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-glukopyranosyl-bromidem za podmínek fázové katalýzy připravena směs acetylmonoglukosidu XXV a acetyldiglukosidu. Acetylmonoglukosid XXV byl izolován, deacetylován methoxidem sodným v methanolu na monoglukosid, který byl demethylován natrium-ethanthiolátem na piceid (II).

Lze říci, že totální syntéza resveratrolu není složitá, spíše je pracná a zdoluhavá a některé výchozí sloučeniny (zvláště 3,5-disubstituované) jsou obtížněji dostupné. To je také důvod, proč cena komerčně nabízeného resveratrolu je na úrovni cca 20 000,- Kč.g⁻¹) (cit.⁴⁷).

8. Praktické využití resveratrolu v současnosti

V USA se v současné době nabízí řada preparátů obsahujících buď čistý resveratrol, nebo směs polyfenolů z vinných hroznů, často v kombinaci s extraktem z jader vinných hroznů. Přípravky jsou deklarovány jako potravinové fortifikační doplňky.

Přípravek LifePath[®] 50 (cit.⁴⁸) obsahuje extrakt z jader hroznů (50 mg), dále koncentrát bioflavonoidů a extrakt z červeného vína, který je uveden jako resveratrol, obsah resveratrolu však není deklarován (cena 180 kapslí je 104 \$). U přípravku jsou uváděny antioxidační, antimutagenní a protizánětlivé účinky. MaxiLife Resveratrol (cit.⁴⁹) je deklarován jako antioxidant s obsahem čistého resveratrolu (60 kapslí za 18 \$). Přípravek ResVerin[™] (cit.⁵⁰) je deklarován jako čistý resveratrol s antioxidačními a chemopreventivními účinky.

Přípravek Resveratrol (cit.⁵¹) je roztok resveratrolu (obsah resveratrolu není udán) v 11 % alkoholu, láhev o obsahu 32 oz (není jasné, zda se jedná o „fluid ounce“ tj. 28,413 ml či „ounce apothecaries“ tj. 31,1035 g), tj. cca 0,9 l, se nabízí za 14,95 \$ a je určena na 1 týden (kvalitní červené víno má stejný obsah alkoholu a obsahuje také resveratrol, pozn. aut.).

Vitaminy, po poznání jejich významu pro výživu, byly nejprve podávány v lékové formě jako doplňky k výživě a následně pak byly aplikovány v kosmetice. Stejně tak je tomu s resveratrole. Jak je uvedeno výše, preparáty pro výživu s resveratrole se již nabízejí. Kosmetické přípravky s resveratrole na trhu ještě nejsou, ale přední světová francouzská firma L'ORÉAL již podala patentové přihlášky na použití hydroxystilbenů (zmíněn je resveratrol) v kosmetických přípravcích⁵²⁻⁵⁴.

9. Závěr

Biologické účinky resveratrolu a dalších antioxidantů se v současné době intenzivně studují. Konzumace potravin obsahujících resveratrol (tedy zeleniny) je zcela jistě zdraví prospěšná, jako ostatně byla i předtím, než bylo zjištěno, že obsahuje resveratrol.

Určitým pokrokem nepochybně je, že na základě výsledků řady studií se ukázalo pití vína v rozumném množství spíše zdravé než škodlivé. Tento fakt jistě přivítají konzumenti vína i jeho výrobci.

Lze předpokládat, že během několika let se resveratrol stane běžnou složkou komerčních multivitaminových preparátů a bude tak dlouho propagován jako nezbytný pro lidské zdraví, než se objeví něco nového stejně nezbytného. Rovněž není vyloučeno, že se stane i účinnou složkou nového léčiva.

Projekt je podporován grantem GA ČR 525/99/1338.

LITERATURA

1. Soleas G. J., Diamandis E. P., Goldberg D. M.: Clin. Biochem. 30, 91 (1997).
2. Soleas G. J., Diamandis E. P., Goldberg D. M.: J. Clin. Lab. Anal. 11, 287 (1997).
3. Kimura Y., Ohminami H., Okuda H., Baba K., Kozawa K., Arichi S.: J. Med. Plant Res. 49, 51 (1983).
4. Arichi S., Kimura Y., Okuda H., Baba K., Kozawa M., Arichi S.: Chem. Pharm. Bull. 30, 1766 (1982).
5. Frankel E. N., Waterhouse A. L., Teissedre P. L.: J. Agric. Food Chem. 43, 890 (1995).
6. Pace-Asciak C. R., Hahn S., Diamandis E. P., Soleas G., Goldberg D. M.: Clin. Chim. Acta 235, 207 (1995).
7. Pace-Asciak C. R., Rounova O., Hahn S. E., Diamandis E. P., Goldberg D. M.: Clin. Chim. Acta 246, 163 (1996).
8. Uenobe F., Nakamura S., Miyazawa M.: Mutat. Res. 373, 197 (1997).
9. Jang M., Cai L., Udeani G. O., Slowing K. V., Thomas C. F., Beecher C. W. W., Fong H. H. S., Farnsworth N. R., Kinghorn A. D., Mehta R. G., Moon R. C., Pezzuto J. M.: Science 275, 218 (1997).
10. Langcake P., Pryce R. J.: Physiol. Plant Pathol. 9, 77 (1976).
11. Langcake P., Cornford C. A., Pryce R. J.: Phytochemistry 18, 1025 (1979).
12. Langcake P., McCarthy W. V.: Vitis 18, 244 (1979).
13. Langcake P.: Physiol. Plant Pathol. 18, 213 (1981).
14. Pool R. M., Creasy L. L., Frackelton A. S.: Vitis 20, 136 (1981).
15. Barlass M., Miller R. M., Douglas T. J.: Am. J. Enol. Vitic. 38, 65 (1987).
16. Fritzemeier K.-H., Kindl H.: Planta 151, 48 (1981).
17. Creasy L. L., Coffee M.: J. Am. Soc. Hortic. Sci. 113, 230 (1988).
18. Hoos G., Blaich R.: J. Phytopathol. 129, 102 (1990).
19. Siemann E. H., Creasy L. L.: Am. J. Enol. Vitic. 43, 49 (1992).
20. Krpeš C.: Vinohrad 1993, 21.
21. Jeandet P., Bessis R., Sbaghi M., Meunier P., Trollat P.: Am. J. Enol. Vitic. 46, 1 (1995).
22. Jeandet P., Bessis R., Sbaghi M., Meunier P.: J. Phytopathol. 143, 135 (1995).
23. Takaoka M.: J. Faculty Sci., Hokkaido Imp. Univ. Ser. III, 3, 1 (1940); citováno dle: Späth E., Kromp K.: Ber. Dtsch. Chem. Ges. 74, 189 (1941) a Siemann E. H., Creasy L. L.: Am. J. Enol. Vitic. 43, 49 (1992).
24. Hanzlíková I.: *Diplomová práce*. Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT, Praha 1999.
25. Blahová R.: *Diplomová práce*. Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT, Praha 2000.
26. Huang K. S., Lin M., Wang Y. H.: Chin. Chem. Lett. 10, 817 (1999); Chem. Abstr. 132, 78410 (2000).
27. Huang K. S., Lin M., Yu L. N., Kong M.: Chin. Chem. Lett. 10, 775 (1999); Chem. Abstr. 132, 76063 (2000).
28. Tanaka T., Ohyama M., Morimoto K., Asai F., Iinuma M.: Phytochemistry 48, 1241 (1998).
29. Adesanya S. A., Nia R., Martin M.-T., Boukamcha N., Montagnac A., Paies M.: J. Nat. Prod. 62, 1694 (1995).
30. Hata K., Kozawa M., Baba K.: Yakugaku Zasshi. 95, 211 (1975).
31. Kimura Y., Ohminami H., Okuda H., Baba K., Kozawa K., Arichi S.: J. Med. Plant. Res. 49, 51 (1983).
32. Nonomura S., Kanagawa H., Makimoto A.: Yakugaku Zasshi 83, 983 (1963), citováno dle: Arichi S., Kimura Y., Okuda H., Baba K., Kozawa M., Arichi S.: Chem. Pharm. Bull. 30, 1766 (1982).
33. Späth E., Schläger J.: Ber. Dtsch. Chem. Ges. 73, 881 (1940).
34. Späth E., Kromp K.: Ber. Dtsch. Chem. Ges. 74, 189 (1941).
35. Späth E., Kromp K.: Ber. Dtsch. Chem. Ges. 74, 867 (1941).
36. Späth E., Liebherr F.: Ber. Dtsch. Chem. Ges. 74, 869 (1941).
37. Moreno-Mañas M., Pleixats R.: An. Quim. Ser. C 81, 157 (1985).
38. Reimann E.: Liebigs Ann. Chem. 750, 109 (1971).
39. Jeandet P., Bessis R., Gautheron B.: Am. J. Enol. Vitic. 42, 41 (1991).
40. Ali M. A., Kondo K., Tsuda Y.: Chem. Pharm. Bull. 40, 1130 (1992).
41. Thakkar K., Geahlen R. L., Cushman M.: J. Med. Chem. 36, 2950 (1993).
42. Meier H., Dullweber U.: J. Org. Chem. 62, 4821 (1997).
43. Feng Y. A., Wang L., Zhao Z. Z.: Chin. Chem. Lett. 9, 1003 (1998); Chem. Abstr. 132, 3275 (2000).
44. Šmidrkal J., Filip V., Melzoch K., Hanzlíková I., Buckiová D., Drašar P.: Chem. Listy 93, 727 (1999).
45. Bachelor F. W., Loman A. A., Snowdon L. R.: Can. J. Chem. 48, 1554 (1970).
46. Alonso E., Ramón D. J., Yus M.: J. Org. Chem. 62, 417 (1997).
47. Orsini F., Pelizzoni F., Bellini B., Miglierini G.: Carbohydr. Res. 301, 95 (1997).
48. Sigma Company: firemní bulletin sv. 3, č. 1, Spring 1997.
49. The Enrich Corporation, http://www.enrich.com/us/prod_cat_eng/prod_13620.htm
50. Vitamin Plus, <http://www.vitaminplus.com/cgi-vin/vplus/vplus.exe>
51. Resverin; <http://www.resverin.com/specs.html>
52. Lighthouse Health Products Inc., USA; <http://www.lighthousehealth.com/order.html>
53. Breton L., Pineau N. (Oreal S. A.): FR 2777183A1; Chem. Abstr. 132, 26656 (2000).
54. Breton L., Pineau N. (Oreal S. A.): FR 2777184A1; Chem. Abstr. 132, 26657 (2000).
55. Breton L., Liviero C. (Oreal S. A.): FR 2777186A1; Chem. Abstr. 132, 26659 (2000).

J. Šmidrkal^a, V. Filip^a, K. Melzoch^b, I. Hanzlíková^b, D. Buckiová^c, and B. Křísá^d (^aDepartment of Dairy and Fat Technology, ^bDepartment of Fermentation Chemistry and Bioengineering, Institute of Chemical Technology Prague, ^cInstitute of Experimental Medicine, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, ^dDepartment of Botany, Faculty of Science, Charles University, Prague): **Resveratrol**

Resveratrol is the parent compound of a family of compounds exhibiting interesting biological activities. Their discovery, total synthesis, content in wine and some vegetables, and biological properties are discussed in this review.

BRASSINOSTEROIDY

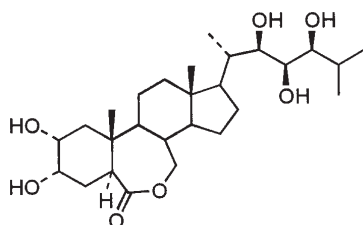
LADISLAV KOHOUT

Ústav organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6

Došlo dne 12.IV.2001

Klíčová slova: brassinosteroidy

Rostlinné hormony (fytohormony) jsou látky, které po rostlinném organismu roznášejí signál vyvolávající fyziologickou odpověď (odezvu). V posledních letech se užívá spíše pojem regulátory růstu rostlin. Brassinosteroidy představují jeden z typů regulátorů růstu rostlin. Prvním brassinosteroidem izolovaným z rostlinného materiálu byl brassinolid [(22*R*,23*R*,24*S*)-2 α ,3 α ,22,23-tetrahydroxy-24-methyl-7 α -hommo-7-oxa-5 α -cholestan-6-on].



Byl pojmenován podle rostliny, z jejíhož pylu byl poprvé izolován – *Brassica napus* (řepka). Tato sloučenina se však nevyskytuje jenom v této jedné rostlině. Brassinolid byl izolován z mnoha rostlinných druhů, např. kaštanu, čajovníku, slunečnice, borovice, rýže, olše, fazole, mořských řas, je přítomen i ve včelím medu atd. Bylo prokázáno, že brassinolid u rostlin zvyšuje počet buněk a prodlužuje je. Z makropohledu se tento vliv projevuje zvětšením množství zelené hmoty, suché hmoty, zvýšením počtu nasazených květů, zvýšením jak množství tak velikostí plodů atd. Jeho účinek je pozorovatelný již při aplikaci množství $4 \cdot 10^{-12}$ g na jednu rostlinu. Při počtu 250 rostlin na 1 m² to znamená $1 \cdot 10^{-5}$ g na hektar. Maximální účinek je však při asi 1000 $\times$ vyšším množství, tj. kolem 0,01 g na ha.

V poslední době se začíná studovat protistresový účinek brassinolidu, který se projevuje zvýšenou odolností rostlin proti stresu, kterému je rostlina vystavena, například působení herbicidu, chladu, sucha, nedostatku živin apod.

Brassinolid je však i při své vysoké účinnosti velmi drahý.

V přírodních materiálech je obsažen ve velmi malém množství (nejvíce v pylu řepky, 0,1 ppm). Synteticky je obtížně přístupný. Proto se používají jeho analoga, brassinosteroidy. Brassinosteroidy jsou dnes považovány za podstatné pro vývoj rostliny. Nejsou-li přítomny, rostlina nemůže žít.

Problémy, které se dnes v této oblasti řeší, se dotýkají několika oborů. V chemii se studuje syntéza a vzájemný vztah mezi strukturou a aktivitou. Biologie studuje vztah mezi brassinosteroidy a dalšími rostlinnými hormony, pokouší se také objasnit, jaké změny brassinosteroidy vyvolávají v rostlinném organismu, zabývá se i mechanismem účinku. Rovněž genetika studuje mechanismus; nejvíce se pracuje na huseníčku (*Arabidopsis thaliana*), u kterého se podařilo pozměnit jeden z genů tak, že pozměněná rostlina není schopna syntetizovat brassinolid. Na zemědělských pracovištích se pak hledá nejlepší způsob aplikace v závislosti na typu rostliny, stadiu jejího vývoje a vnějších podmínkách (zvláště stresových: sucho, chlad, pesticidy, sůl).

Brassinosteroidy se zabýváme i v Ústavu organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky. Jedním z řešených problémů je vztah mezi strukturou a aktivitou. Naše řešení je založeno na dvou přístupech. První spočívá v tom, že ne všechny strukturální rysy přírodního brassinolidu jsou nutné pro vysokou biologickou aktivitu. Podstatou druhého je to, že vzhledem k velmi vysoké účinnosti, ale současně obtížné syntetizovatelnosti brassinolidu, by byla výhodnou taková sloučenina, která by mohla být i méně účinná, ale přitom levnější než brassinolid. Pak by se jí sice používalo více, ale přesto by celková cena klesla.

Na základě těchto úvah se nám skutečně podařilo syntetizovat některé vysoce aktivní sloučeniny. Syntetizovali jsme dokonce i první sloučeninu s opačnou aktivitou, tj. látku typu brassinosteroidů, která brzdí růst rostlin. Tento zdánlivě neúčinný poznatek je velmi významný pro pochopení vztahu mezi chemickou strukturou a biologickým účinkem brassinosteroidů.

Druhým problémem, kterým se zabýváme, je izolace brassinosteroidního receptoru z rostlin. Úspěch v této izolaci by byl významný jak pro studium mechanismu účinku brassinosteroidů v rostlinách, tak pro testování aktivity syntetizovaných nových sloučenin.

Třetí problém, který studujeme, je protistresová aktivita. Toto studium je teprve na počátku. V ÚOCHB AV ČR byl vyvinut nový test stanovení protistresové aktivity. Jak jsem se již zmínil, účinky brassinosteroidů lze rozdělit na účinky podporující růst rostlin a na protistresové účinky. Oba tyto účinky jsou enormně důležité. První může ovlivnit kvalitu a kvantitu rostlin, druhý pak kvalitu životního prostředí. Oba tyto účinky pro náš život potřebujeme.

POLYFENOLOVÉ LÁTKY PIVA – PŘÍROZENÉ ANTIOXIDANTY

JAROSLAV ČEPIČKA a MARCEL KARABÍN

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6
e-mail: Jaroslav.Cepicka@vscht.cz

Došlo dne 10.VIII.2001

Klíčová slova: polyfenoly, flavonoidy, antioxidace

Obsah

1. Úvod
2. Chemická struktura přírodních polyfenolů piva
3. Reakce polyfenolů piva a jejich změny v technologii
4. Zdravotní a hygienické účinky polyfenolových složek piva
5. Závěr

1. Úvod

Pivo je oblíbený slabě alkoholický nápoj, který je pro svůj osvěžující charakter, příjemnou hořkou chuť a dietetické účinky velmi rozšířen u nás i v zahraničí. Jeho obliba se projevuje v celosvětovém růstu výroby.

Jedním z hlavních problémů pivovarského průmyslu je zajištění dostatečně vysoké trvanlivosti piva. Současný trend směřuje k prodeji piva v lahvích a plechovkách, což je důsledek změny životního stylu a extenzivnějšího exportu. Všeobecně se dnes požaduje až roční garantovaná trvanlivost. Vysoká trvanlivost piva neznamena pouze zachování čisti, která je dnes samozřejmým požadavkem, ale také udržení všech ostatních kvalitativních vlastností, jako je chuť, vůně, barva a pěnivost, a to během transportu i při následném skladování. Bohužel ani sebelepší systém výroby a kontroly nedokáže jednoznačně zaručit, že finální výrobek bude mít dobrou senzickou stabilitu.

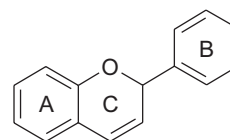
Jedny ze složek, které mají těsný vztah k popsaným kvalitativním znakům a stabilitě piva, jsou polyfenolové látky. Do piva se dostávají z ječmene, resp. sladu, chmele a chmelových výrobků jako přírodní složky, které dalekosáhle ovlivňují jeho senzickou vlastnosti i celkovou trvanlivost.

Rostlinné polyfenoly jsou amorfni látky fenolické povahy, které jsou rozšířeny v nejrůznějších částech rostlin – v kůře, dřevě, listech, plodech, kořenech i v patologických útvech. Jsou charakteristické řadou zevních společných vlastností. Vyčnížují kůží, srážejí roztoky želatiny i alkaloidů, se železitými solemi dávají tmavé sraženiny, oxidují se v alkalickém prostředí atd. Jsou v rostlinné říši všudypřítomné, dodávají rostlinám charakteristické zbarvení, někdy příznačnou chuť plodům, ale nejčastěji jsou smyslově nevýrazné.

Jeich hlavními představiteli jsou flavonoidy, zahrnují se však mezi ně i kumarinové deriváty, chinony, ubichinony, štěpné produkty testinových kyselin, deriváty kyseliny chlorogenové a volné fenolové kyseliny.

2. Chemická struktura přírodních polyfenolů piva

Nejvíce zastoupenou skupinu polyfenolových složek piva představují flavonoidy, které patří do rozsáhlé skupiny rostlinných fenolů obsahujících v molekule dvě benzenová jádra spojená tříuhlíkatým řetězcem v uspořádání $C_6-C_3-C_6$ a jejichž struktura se odvozuje od skeletu heterocyklického flavanu (*I*).



I flavan

Uvedené polyfenoly se obvykle rozdělují do čtyř podskupin na chalkony, flavanoidy, flavonoly a anthokyanidiny¹. Chalkony jsou prvními intermediáty v biosyntéze flavonoidů vznikajícími reakcí mezi kyselinou kumarovou a třemi acetátovými jednotkami, katalyzovanou enzymem chalkonsynthasou (schéma 1). Další adice prenylu nebo geranylu mohou vést k prenylovaným chalkonům. Flavanonová struktura vzniká isomerací chalkonu enzymem chalkonisomerasou a její následná oxidace vede k flavanolům, kdežto redukce k flavanolům. Flavanolová polymerace může dále vést k dobře známým proanthokyanogenům. V tomto případě se vytváří vazba mezi C-8 kruhu A a C-4 prostředního můstku. Krátké polymery s méně než 10 jednotkami jsou obvykle označovány za oligomery, kdežto dlouhé řetězce polymerů jsou známy jako taniny².

Ze chmele se dostávají do piva navíc prenylované flavonoidy s prenylovým substituentem na kruhu A. Více než 80 % z nich tvoří xanthohumol, který přechází do piva v isomerované formě jako isoxanthohumol³.

Skupina flavanoidů je extrémně diverzifikovaná. Ve flavonech a isoflavonech je 2,3-dvojná vazba konjugovaná s 4-oxo funkcí, ve flavan-3,4-diolech jsou hydroxyskupiny na uhlících C-3 a C-4, ve flavan-3-olech je jen jedna hydroxyskupina v pozici C-3 a ve flavanonech je v pozici C-4 oxoskupina. B kruh se může také posunout do polohy C-3 nebo C-4, jak je tomu v případě isoflavonů a neoflavonů.

Do piva přecházející flavanoly ze chmele jsou reprezentovány hlavně flavan-3-oly katechinem (*II*) a anthokyanogeny (*III*) (cit.⁴). Autoři izolovali ze chmele odrůdy Bullion šest flavanoidních subfrakcí: monomery, dimery, trimery a tři polymerní frakce se zdánlivým polymeračním stupněm 3,76 až 11,7.

Z výsledků prezentovaných autory vyplynulo, že jednodu-

ché flavanoly (monomery, dimery a trimery) představují pouze menší díl chmelových flavanoidů. Nalezli dva monomery, katechin a epikatechin. Proanthokyanidin B1 (obsahující molekulu katechinu vázanou na epikatechin) a proanthokyanidin

B3 (dvě molekuly katechinu) tvořily většinu dimerové frakce, zatímco hlavním trimerem byl proanthokyanidin C2 (tři katechinové jednotky). Oligomerní frakce byla přítomna v největším množství a tvořila až 80 % flavanoidního extraktu chmele.

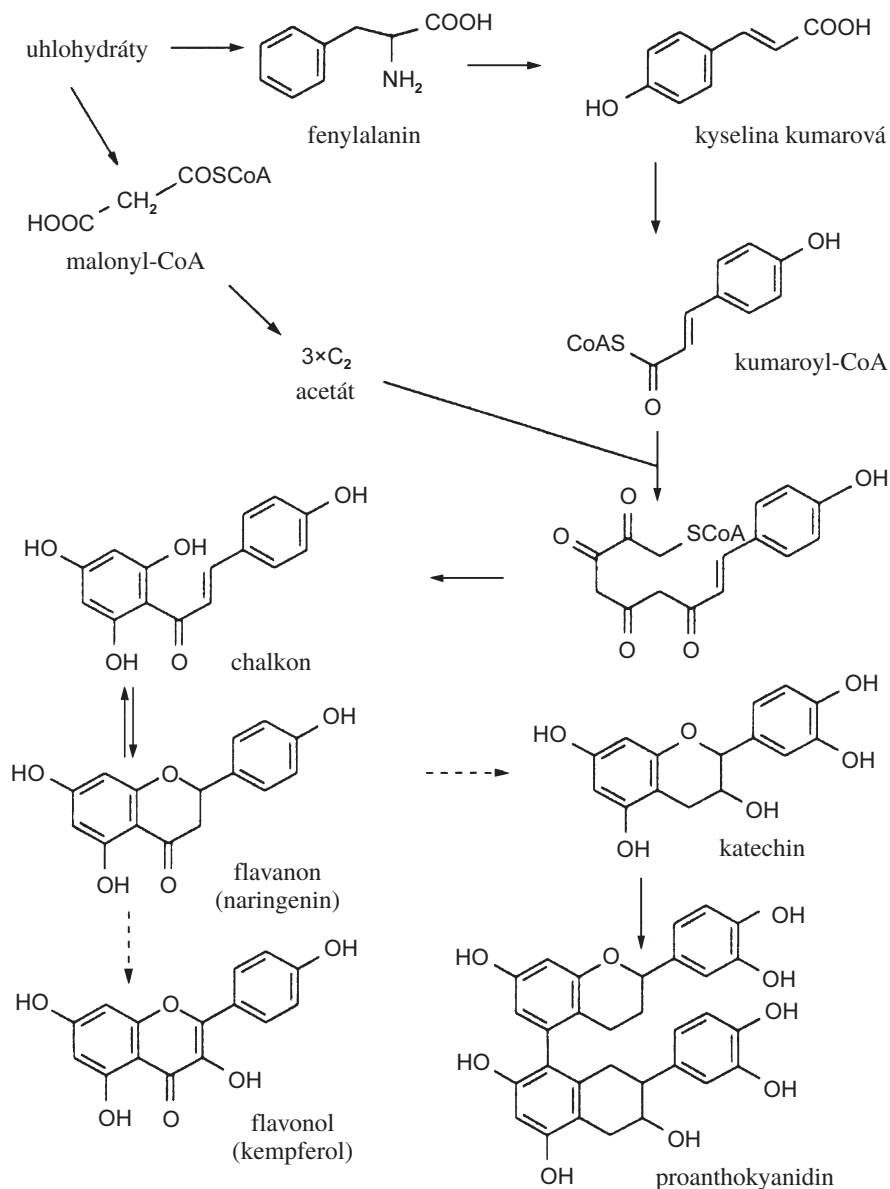
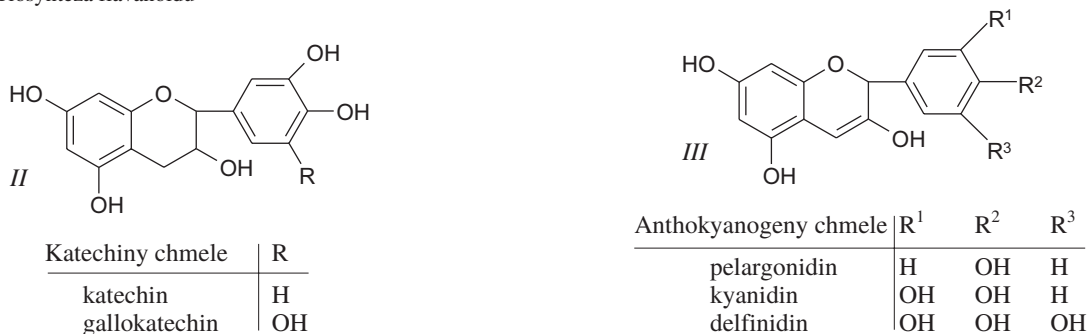


Schéma 1. Biosyntéza flavanoidů^{2,3}



Flavanoly přicházejí do pivovarského procesu ze surovin převážně ve formě flavonolových glykosidů. Většina z nich byla identifikována jako mono-, di- a tri-glykosidy kvercetin (IV) a kempferolu (V) a bylo přítomno jen malé množství myricetinu. Čtyři hlavní zastoupené glykosidy byly kvercetin a kempferol- β -3-glukosidy a β -3-rutinosidy⁵.

Přestože chmelovar umožňuje extrakci 90 % flavonolových glykosidů, jsou nalézány ve velmi nízkých koncentracích jak v mladině, tak i v pivu. Přes jejich vysoké antioxidační účinky se předpokládá, že flavanoly jen málo přispívají k redukční síle chmele a mladiny. Čtyři hlavní glykosidy byly kvercetin, kempferol, β -3-glukosidy a β -3-rutinosidy^{6,7}. Podle VanSumere a spol.⁸ existuje velká variabilita v poměrech glykosidů u jednotlivých odrůd, což umožňuje identifikaci kultivarů.

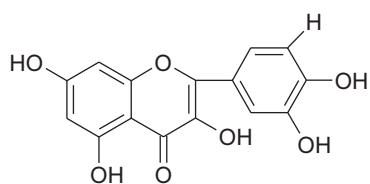
Kumarinové deriváty jsou přímo ve chmelu, v ječmeni i ve sladu. Vyskytují se buď jako volné aglykony nebo jako glyko-

sidy, obvykle β -D-glukosidy^{9,10}. Jejich struktura je odvozena od laktónů *o*-hydroxykyselin, zejména kyseliny *o*-hydroxyskořicové (VI), resp. kumarinu (VII) (schéma 2).

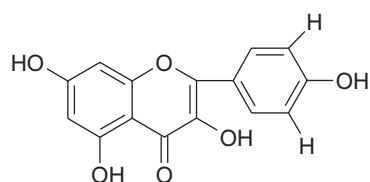
Chinony a ubichinony přecházejí do piva z ječmene a sladu pouze jako minoritní složky a jejich role je spojena s oxidoredukčními přeměnami¹¹. Deriváty kyseliny chlorogenové tvoří bohatou skupinu aromatických hydroxy- a methoxykyselin odvozených převážně od kyseliny chlorogenové (VIII), kyseliny kávové (X) (schéma 3) a kyseliny *p*-hydroxybenzoové (XI). Mohou snadno podléhat kondenzačním reakcím a oxidačním přeměnám na chinony, které se napojují na chemismus hnědnutí mladiny¹².

Aromatické kyseliny a stejné produkty testinových kyselin jsou představovány zejména kyselinou vanilinovou (XIV), ferulovou (XIX), syringovou (XV) a sinapovou (XX), které se vyskytují v klíčcích sladovaného ječmene i ve chmelu¹³. Do této skupiny polyfenolových látek patří i cukerné estery kyseliny gallové, častěji *m*-digallové a deriváty kyseliny ellagové (XXI), která je oxidačním produktem kyseliny gallové.

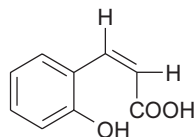
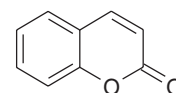
Z uvedeného přehledu je patrná široká diverzifikace polyfenolových složek přecházejících v průběhu pivovarského procesu do piva buď v nepozměněné, ale ještě častěji v pozměněné formě. Situace se stává navíc složitější tím, že důležitý zdroj polyfenolů piva, chmel, se v současné době stále více zpracovává ve formě chmelových výrobků (extraktů, pelet,



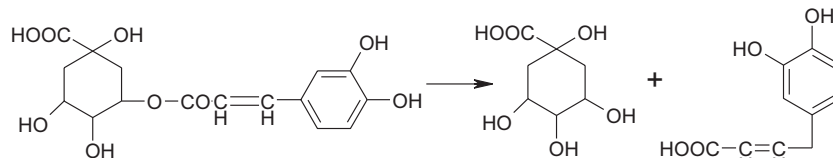
IV kvercetin



V kempferol

VI kyselina *o*-hydroxyskořicová

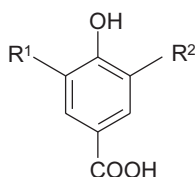
VII kumarin

Schéma 2. Tvorba kumarinu z kyseliny *o*-hydroxyskořicové

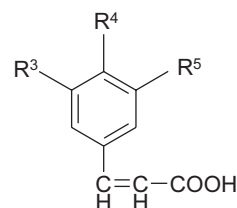
VIII kyselina chlorogenová

IX kyselina chinová X kyselina kávová

Schéma 3. Štěpení kyseliny chlorogenové



Deriváty kyseliny <i>p</i> -hydroxybenzoové	R ¹	R ²
XI kyselina <i>p</i> -hydroxybenzoová	H	H
XII kyselina protokatechová	OH	H
XIII kyselina gallová	OH	OH
XIV kyselina vanilinová	H	OCH ₃
XV kyselina syringová	OCH ₃	OCH ₃



Deriváty kyseliny skořicové	R ³	R ⁴	R ⁵
XVI kyselina skořicová	H	H	H
XVII kyselina <i>p</i> -kumarová	H	OH	H
XVIII kyselina kávová	H	OH	OH
XIX kyselina ferulová	H	OH	OCH ₃
XX kyselina sinapová	OCH ₃	OH	OCH ₃

hydrogenovaných a isomerovaných preparátů), při jejichž výrobě dochází ke změnám složení polyfenolových látek.

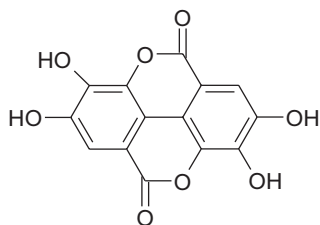
3. Reakce přírodních polyfenolů a jejich změny v technologii

V pivu je přítomna široká škála polyfenolových látek. Složky o nižší molekulové hmotnosti, představované zejména volnými aromatickými kyselinami, jsou přítomny v menší míře a méně se uplatňují v pivovarském procesu než složitější flavonoidy, zejména flavanoly a jim strukturálně podobné flavonoly.

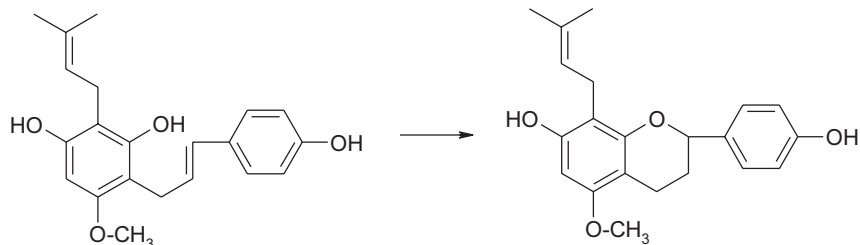
Toto jednoduché rozdělení potvrdil a upřesnil Ros^{14,15} v jedné z nejnovějších klasifikací polyfenolů vyskytujících se v pivovarském procesu. Polyfenolové látky rozdělil do dvou velkých skupin. První jsou fenolické kyseliny zahrnující deriváty kyseliny benzoové (ortho- i para-) a deriváty kyseliny skořicové (XVI). Do první podskupiny patří kyselina salicylová, kyselina gentisová, kyselina *p*-hydroxybenzoová (XI), kyselina protokatechová (XII), kyselina gallová (XIII), kyselina vanilinová (XIV) a kyselina syringová (XV). Do druhé podskupiny patří kyselina *p*-kumarová (XVII), kyselina kávová (XVIII), kyselina ferulová (XIX) a kyselina sinapová XX. Druhou velkou skupinou jsou flavonoidy. Ty jsou dále rozděleny na flavany (flavanoly a prokyanidiny), anthokyany a flavonoly.

V průběhu pivovarské technologie dochází k řadě chemických přeměn polyfenolových složek pocházejících z původních surovin, především v průběhu chmelovaru, kvašení, filtrace, a stabilizace koloidních vlastností piva. Neméně významnými změnami jsou procesy stárnutí piva, které se projevují snížením sensorické kvality dlouhodobě skladovaného piva. Jedná se o reakce hydrolytické, isomerační, kondenzační až polymerační a oxidoredukční.

Hydrolytické reakce vedou obvykle ke štěpení glykosidů



XXI kyselina ellagová



XXII xanthohumol

XXIII isoxanthohumol

Schéma 4. Isomerace xanthohumolu při chmelovaru¹⁶

na aglykony a odpovídající sacharidické složky a výrazně se v kvalitě hotového piva neuplatňují. Z isomeračních reakcí je nutno uvést především přeměnu xanthohumolu (XXII) na isoxanthohumol (XXIII) během chmelovaru¹⁶ (schéma 4).

Kondenzační až polymerační reakce se uplatňují především ve smyslu tvorby výšmolekulárních celků s vysokou srážecí aktivitou vůči bílkovinám extraktu piva. Tím dochází k tvorbě polyfenol-bílkovinných komplexů, které za určitých podmínek mohou vypadávat z roztoku, a tím vytvářet koloidní zákaly. Teorii vazeb polyfenolových látek na bílkoviny vypracoval Siebert a spol.^{17–20} Na základě studií modelových systémů v různých nápojích prokázali, že zákalotvorné polyfenolové složky mají dvě a více vazebných míst, kterými se váží na specifická místa zákalotvorných bílkovin, jejichž počet souvisí s obsahem aminokyseliny prolinu. Vazby polyfenolových složek na bílkoviny se uskutečňují na principu nekovaletních interakcí a tvorbou můstků mezi molekulami. Hydrofobní interakce se uplatňují ve větší míře než vodíkové můstky. Vazebná schopnost, specifita a dostupnost vazebných míst závisí na chemické a fyzikálně-chemické povaze polyfenolů. Důležitou roli v těchto procesech hraje i pH prostředí. Vhodnými stabilizačními postupy, dnes založenými především na adsorpci zákalotvorných prekurzorů na inertní filtrační materiály, lze tvorbu koloidních zákalů výrazně potlačit. Koloidní stabilizace piv se uplatňuje především při výrobě exportních piv s požadovanou dlouhodobou trvanlivostí a považuje se dnes za technicky vyřešenou.

Dosud nevyřešeným problémem pivovarské technologie však zůstává otázka sensorické stability piva, která přímo souvisí s oxidačně-redukčními procesy probíhajícími v pivu po naplnění do konzumního obalu. Uvedené procesy jsou souhrnně nazývány stárnutím piva a polyfenolové složky v něm hrají důležitou roli. Působením světla, tepla, kovových iontů, mechanického pohybu a dalších faktorů jsou iniciovány reakce, vedoucí ke tvorbě volných radikálů způsobujících autooxidaci polynenasycených lipidických složek extraktu piva. To má za následek tvorbu těkavých karbonylových sloučenin odpovědných za nepříznivé chutové změny vyvolané širokou škálou karbonylových látek.

Tvorba karbonylových sloučenin probíhá několika různými mechanismy. Antioxidanty pak mohou působit jako „lapače“ volných radikálů a kyslíku a rovněž tak jako maskovací činidla v důsledku tvorby chelátů s kovovými ionty. Polyfenoly a zejména flavanoidy jsou přitom považovány za nejúčinnější přirozené antioxidanty piva.

Irwin²¹ se spolupracovníky dospěli k závěru, že všeobecné ovlivnění chutové stability polyfenolovými látkami závisí na

absolutní i relativní koncentraci trihydroxy- i dihydroxy- flavanoidů v pivu. Bylo zjištěno, že trihydroxyflavany, např. prodelphinidin, mohou působit jako prooxidanty v mechanismu senzorkického stárnutí piva, zatímco dihydroxyflavany, např. katechin a prokyanidin B3 mohou chránit citlivé látky před oxidací a nejsou schopny vystupovat jako prooxidanty.

Biovin²² se spolupracovníky rovněž referuje o zcela jasné závislosti antioxidačních vlastností sladu, resp. sladiny na obsahu a skladbě polyfenolových látek. I podle těchto autorů tvoří polyfenoly hlavní přirozené antioxidanty piva a působí dvěma mechanismy, jako lapače volných radikálů a jako inhibitory aktivity lipoxygenas. Dále zjistili, že antioxidační účinnost sladu je závislá na odrůdě ječmene a technologii sladování.

Stárnutí piva se tak stává jedním z klíčových problémů pivovarského výzkumu a technologie. V současnosti se všeobecně uznává platnost radikálové teorie, podle níž se při stárnutí uplatňují zejména radikály organických i anorganických sloučenin, které podporují průběh radikálových procesů. Zvláštní význam při tom mají sloučeniny kyslíku, popř. jeho excitované stavy.

Polyfenolové složky piva mají silné antioxidační vlastnosti²³. Jsou např. schopny likvidovat hydroxylové radikály generované při fotolýze peroxidu vodíku, reagují s O_2^- a 1O_2 a s peroxyradikály, včetně terminace řetězové reakce během autooxidace mastných kyselin. Autoři zjistili, že aktivita flavonoidů klesá v pořadí myricetin > kvercetin > rhamnetin > naringenin > katechin > 5,7-dihydroxy-3',4',5'-trimethoxyflavon > kempferol > flavon. Aktivita vzrůstá s počtem hydroxylových skupin substituovaných na aromatickém kruhu B a přítomnost hydroxylové na C-3 a jeho glykosylace dále nezvyšuje „pohlcovací“ účinnost. Řada z přírodních polyfenolových složek je silnějšími antioxidanty, než jsou prokázány antioxidačně účinné vitaminy C, E a provitamin β -karoten.

4. Zdravotní a hygienické účinky polyfenolových složek piva

Přesný vliv polyfenolových složek piva na lidské zdraví se přisuzuje především jejich antioxidačním účinkům, které jsou schopny eliminovat negativní účinky volných radikálů v krvi. Souhrnně mají polyfenoly široké spektrum příznivých účinků na lidské zdraví, zahrnující účinky antioxidační, antikancerogenní, antimikrobiální, imunomodulační a protizánětlivé. Dále se účastní procesů regulace tlaku krve a hladiny glukózy v krvi²⁴.

Jestliže jsou antioxidační fenolické komponenty stále přijímány pravidelnou spotřebou nápojů obsahujících právě tyto látky, snižují kolektivně trombotické jevy, a tím přispívají ke zlepšení aterosklerózy a snížení výskytu onemocnění a úmrtnosti na nemoci cévní soustavy. Bylo zjištěno, že fenolické látky piva a červeného vína inhibují mědi katalyzovanou oxidaci LDL (nízkodenzitní lipoprotein), a tudíž mají vůči ní silné antioxidační účinky²⁴.

Ve chmelu a v pivu přítomné prenylované flavonoidy jsou schopny inhibovat oxidaci LDL, hrající klíčovou roli při vzniku aterosklerózy^{25,26}. Hlavní prenylchalon xanthohumol vykazuje vysokou antioxidační aktivitu při inhibici oxidace LDL, vyšší než α -tokoferol, ale nižší než flavonol kvercetin. V pivu se navíc nachází i jeho isomer isoxanthohumol s prokázaným

antikancerogenním potenciálem. Při blokování škodlivě působících enzymů je dokonce účinnější než xanthohumol¹¹. Polyfenoly obsažené v pivu jsou schopny vázat LDL a VLDL (nízko- a velmi nízkodenzitní lipoprotein) v plazmě, a chránit je tak proti oxidaci *ex vivo*. Obdobné účinky vykazuje i ubichinon-10. Navíc se předpokládá, že xanthohumol je původcem oestrogenní aktivity²⁷.

Z uvedeného přehledu jsou zřejmé příznivé účinky polyfenolových složek piva na lidské zdraví. Na druhé straně nelze opominout v pivu obsažený alkohol, který naopak může být při přílišné konzumaci původcem řady zdravotních poškození. Zdraví prospěšná konzumace, tzv. řízené neboli moderované pití by nemělo přesáhnout podle různých zdrojů 0,5 až 1 litr denně, posuzováno však vždy s ohledem na celkový zdravotní stav konzumenta. Při konzumaci piva je doporučováno pít pivo během jídla, aby jeho vstřebávání bylo pomalejší a ochranný účinek delší.

5. Závěr

Přírodní polyfenolové složky piva pocházející z ječmene, sladu a chmele vykazují výrazné antioxidační účinky, které se projevují především v inhibici oxidačních přeměn lipidických složek, a tím blokováním procesů stárnutí chuti piva. Příměšená konzumace piva je jedním z možných zdrojů přírodních antioxidantů a látek s prokazatelnými antisklerotickými, antikancerogenními, antimikrobiálními, antioxidačními, oestrogenními, imunomodulačními a protizánětlivými účinky.

LITERATURA

1. Rice-Evans C., Miller N. J., Paganga G.: Free Radical Biol. Med. 20, 933 (1996).
2. Stevens J. F., Miranda C. L., Buhler D. R.: J. Am. Soc. Brew. Chem. 56, 136 (1998).
3. Stevens J. F., Ivancic M., Hsu V. L., Deinzer M. L.: Phytochemistry 44, 1575 (1997).
4. McMurrough I., Henningan G. P.: J. Inst. Brew. 90, 24 (1984).
5. McMurrough I.: J. Chromatogr. 218, 683 (1981).
6. McMurrough I., Henningan G. P., Malcolm J. L.: J. Agric. Food. Chem. 30, 1102 (1982).
7. Sägeser M., Deinzer M. L.: J. Am. Soc. Brew. Chem. 54, 129 (1996).
8. VanSumere C. F., Vande Castele K., Hutsebaut W., Everaert E., De Cooman L., Meulemans W.: EBC Monograph XIII, 146 (1987).
9. Moll M.: Brauwelt 124, 17 (1984).
10. Kretschmer K. F.: Brauwelt 135, 1372 (1995).
11. Vinson J. A., Jinhee J., Jihong Y., Dabbagh Y., Xiquan L., Mamdouh S., Proch J., Songhuai C.: J. Agric. Food. Chem. 47, 2502 (1999).
12. Marinova E. M., Yanishieva N. V.: J. Am. Oil Chem. Soc. 71, 427 (1994).
13. McMurrough I., Roche G. P., Cleary K. G.: J. Inst. Brew. 90, 181 (1984).
14. Ros I.: Cerveza Malta 35(1), 38 (1998).
15. Ros I.: Cerveza Malta 35(2), 22 (1998).
16. Stevens J. F., Taylor A. W., Deinzer M. L.: J. Chromatogr., A 832, 97 (1999).

17. Siebert K. J., Troukhanova N. V., Lynn P. Y.: *J. Agric. Food Chem.* **44**, 80 (1996).
18. Siebert K. J., Carrasco A., Troukhanova N. V., Lynn P. Y.: *J. Agric. Food Chem.* **44**, 1997 (1996).
19. Siebert K. J., Lynn P. Y.: *J. Agric. Food Chem.* **45**, 4275 (1997).
20. Siebert K. J., Lynn P. Y.: *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **56**, 24 (1998).
21. Irwin A. J., Barker R. L., Pipats P.: *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **49**, 140 (1991).
22. Boivin P., Malanda M., Maillard M. N., Berset C., Richard H., Hugues M., Richard-Forget F., Nicolas J.: *Proc. EBC Congr., Brussels 1995*, str. 159.
23. Husain S. R., Gillard J., Gillard P.: *Phytochemistry* **26**, 2489 (1987).
24. Pendl A., Biendl M.: *Brauwelt Int.* **IV**, 310 (2000).
25. Miranda C. L., Stevens J. F., Ivanov V., MaCall M., Frei B., Deinzer M. L., Buhler D. R.: *J. Agric. Food Chem.* **48**, 3876 (2000).
26. Mosinger B.: *Cor Vasa* **36**, 171 (1994).
27. Keukeleire D., De Cooman L., Rong H., Heyerick A., Kalita J., Milligan S. R., v knize: *Plant Polyphenols*, 2. díl, str. 739. Kluwer Academic, New York 1999.

J. Čepička and M. Karabín (*Department of Fermentation Chemistry and Bioengineering, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Polyphenolic Compounds of Beer – Natural Antioxidants**

The review summarizes the current knowledge of beer polyphenols, their chemical structure and classification. Biosynthesis pathways of some polyphenolic compounds are also included. Great attention is devoted to chemical reactions, which take place during brewing technology, in relation to colloidal and sensory stability of beer. Further, the health prevention properties of beer polyphenolics are discussed.

PHYTOESTROGENY VE VÝŽIVĚ – PŘÍNÁŠEJÍ UŽITEK NEBO RIZIKO?

JITKA MORAVCOVÁ^a a TEREZA KLEINOVÁ^{a,b}

^aÚstav chemie přírodních látek, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^bVýzkumný ústav živočišné výroby, Přátelství 815, 104 00 Praha 10
e-mail: Jitka.Moravcova@vscht.cz

Došlo dne 17.1.2002

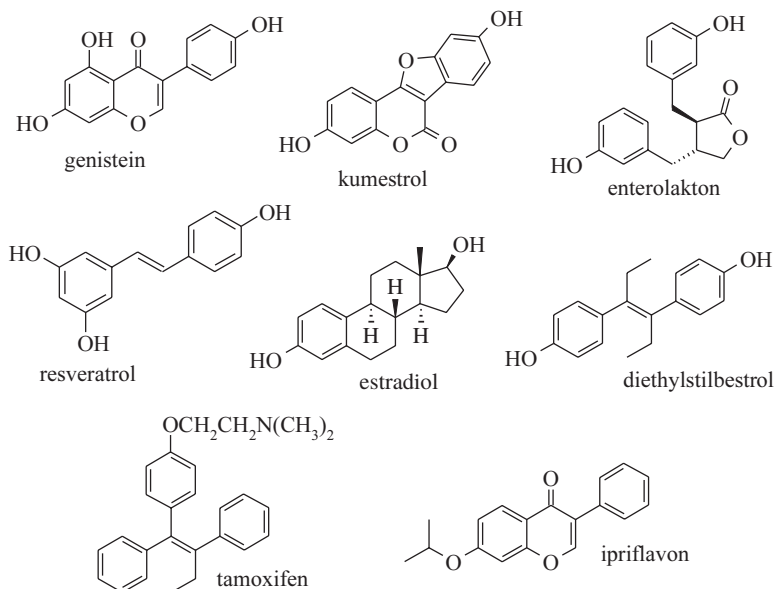
Klíčová slova: fytoestrogeny, estrogeny, biologické účinky, metabolismus, výživa, sója

Obsah

1. Úvod
2. Výskyt
3. Metabolismus a farmakokinetika
4. Sója jako zdroj fytoestrogenů
5. Účinek fytoestrogenů na lidské zdraví
 - 5.1. Kardiovaskulární onemocnění
 - 5.2. Nádorová onemocnění
 - 5.3. Osteoporosa, symptomy menopauzy, angiogenese a metabolismus estrogenů
6. Závěr

1. Úvod

Fenolické sekundární metabolity napodobující strukturu



Obr. 1. Struktura vybraných fytoestrogenů genisteinu (isoflavon), kumestrolu (kumestan), enterolaktonu (lignan) a resveratrolu (stilben) v porovnání s přirozeným (estradiol) a syntetickým (diethylstilbestrol) estrogenem, antiestrogenem (tamoxifen) a účinným syntetickým isoflavonem (ipriflavon)

přirozených savčích estrogenů jsou obsaženy ve více než 300 rostlinách¹. Isoflavony, lignany, kumestany a stilbeny (obr. 1) tvoří nejrozšířenější skupiny fytoestrogenů a jsou v rostlinách přítomny především ve formě glykosidů. Pro lidskou populaci je hlavním zdrojem fytoestrogenů potrava, ale není zanedbatelná ani expozice environmentálním estrogenům, tzv. xenoestrogenům. V této souvislosti je významné zjištění, že strava bohatá na fytoestrogeny by mohla výrazně snižovat² interakce slabších xenoestrogenů s estrogenními receptory (ER).

2. Výskyt

Isoflavony jsou taxonometricky rozšířeny v přírodě jen úzce, a to v rostlinách vikvovitých (*Viciaceae*). Jejich nejbohatším zdrojem je sója luštinatá, dále se vyskytují v červeném jeteli (*Trifolium pratense*) a v některých léčivých rostlinách, jako je kručinka barvířská (*Genista tinctoria*) a janovec metlatý (*Sarothamnus scoparius*) (cit.³). V malé míře jsou zastoupeny i v žitě a výrobcích z něho, objevují se i v pivu a bourbonu. Nově byly nalezeny i v rybízu a dalším drobném ovoci⁴. Sója obsahuje tři hlavní isoflavonové fytoestrogeny, jejichž aglykony jsou daidzein, genistein a glycitein⁵. Formononetin a biochanin A jsou hlavními isoflavony červeného jetele⁶.

Lignany jsou v nejrůznějších semenech, celých zrnech, luscích zeleniny a v ovoci, ale při technologickém zpracování využívajícím moderní techniky mletí je obvykle frakce lignanů oddělena společně se slupkami a vlákninou. Z tohoto důvodu není lidská strava na lignany příliš bohatá. Nejdůležitějším zdrojem lignanů jsou rostlinné oleje, zejména lněný olej, který obsahuje⁷ v sušině sekoisolariciresinol (SECO)

v koncentraci $0,8 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ vedle minoritního matairesinolu; lněná semena obsahují SECO kolem $3,7$ a po odtučnění $5,5 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$. Dalším zdrojem lignanů je celozrnné žitné pečivo nebo různé typy vlákniny^{8,9} a byly nalezeny i v drobném ovoci¹⁰. Dříve se předpokládalo, že lignany jsou metabolity pouze vyšších rostlin, ale nyní se ví, že existují i přirozené savčí lignany, enterodiol a enterolakton, které byly dokázány v biologických tekutinách lidí i zvířat.

Ačkoliv byla z rostlin izolována řada kumestanů¹¹, z hlediska estrogenní aktivity a obsahu v rostlinném materiálu je nejdůležitější kumestrol, který je základním fytoestrogenem vojtěšky (*Medicago sativa*) (cit.¹²). Pro člověka je opět zdrojem kumestanů potrava, resp. vhodné dietetické doplňky, a to hlavně klíčky vojtěšky s obsahem¹³ kumestrolu v sušině $5,6 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$.

Z derivátů stilbenů je nejdůležitější resveratrol, který je nejvíce obsažen ve slupkách červené révy vinné (*Vitis vinifera*). Jeho koncentrace ve šťávě z červeného hrozna je¹⁴ od $6,3$ do $15,3 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, zatímco pro bílé odrůdy se hodnota pohybuje od $0,2$ do $0,5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$.

3. Metabolismus a farmakokinetika

Isoflavony, lignany i stilbeny procházejí katabolismem podobným jak u lidí, tak u zvířat, zatímco metabolismus kumestanů nebyl doposud popsán.

Absorpce fytoestrogenů je zahájena hydrolyzou glykosidů střevními bakteriálními β -glukosidasami, kyselinou chlorovodíkovou v žaludku nebo β -glukosidasami přítomnými v potravě¹⁵. Po absorpci v tenkém střevě jsou volné aglykony transformovány v játrech na glukuronidy a sulfolukuronidy. Podle profilu konjugátů vylučovaných močí je první způsob, tj. přes glukuronáty, dominantní¹⁶. Tyto konjugáty jsou podobně jako u endogenních estrogenů vylučovány močí a v menší míře stolicí, rovněž přecházejí do žluči a dostávají se do krevního řečiště. Po vyloučení do žluči mohou být konjugované fytoestrogeny znovu hydrolyzovány střevními bakteriemi. Dekonjugace pak může vést k opakované absorpci a degradaci v tenkém střevu¹⁷. Flavony inhibují konjugaci resveratrolu, a tím by mohly zvyšovat jeho biologickou dostupnost¹⁸ pro organismus.

Daidzein je metabolizován¹⁹ na dihydrodaidzein, který se dále transformuje buď na equol nebo *O*-demethylangolensin (ODMA). Schopnost produkovat oba tyto metabolity daidzeinu je individuální a udává se, že jen kolem 30 – 40 % populace vylučuje po podání isoflavonů prokazatelně equol^{20,21}. Metabolismus dětí v neonatálním věku neprodukuje equol vůbec díky nepřítomnosti odpovídající střevní mikroflory²². Genistein přechází na dihydrogenistein, který je dále metabolizován na 6'-hydroxy-ODMA, a konečným metabolitem je *p*-ethylfenol. Nedávno byla identifikována kyselina *p*-hydroxyfenyl-2-propionová jako nový metabolit genisteinu²³. Rostlinné lignany SECO a matairesinol jsou lidskými střevními bakteriemi přeměněny na savčí lignany, enterolakton a enterodiol^{24,25}. Důležitým poznatkem je, že metabolismus fytoestrogenů je variabilní a individuální a závisí na řadě faktorů, jako je pohlaví, stáří, fáze menstruačního cyklu, dávka, doba expozice apod.

Málo je známo o distribuci fytoestrogenů v různých tkáních. Po intravenosním podání daidzeinu krysím samcům byla

nalezena vysoká koncentrace daidzeinu v plazmě, játrech, plicích a ledvinách, střední v kosterním svalstvu, srdci a slezině a jen nízká v mozku a varlatech²⁶. Hladina genisteinu v plazmě po orálním podání krysám byla vyšší u samců než u samic a nejvyšší koncentrace genisteinu, jeho konjugátů a metabolitů byla stanovena ve vagíně, děloze, vaječnících a prostatě²⁷. Koncentrace isoflavonů v játrech, ledvinách a děloze krys je zhruba 2 až $5\times$ vyšší než v plazmě²⁸.

U skupiny žen v postmenopauze²⁹ a zdravých mužů³⁰ ve věku 20 – 40 let bylo zjištěno, že výtěžnost isoflavonů v moči byla vyšší, pokud byl podáván tempeh, pokrm vyráběný ze sójových fazolí fermentačně. To by mohlo naznačovat, že fermentace zvyšuje biologickou dostupnost isoflavonů sóji. Výtěžnost isoflavonů v moči sledované skupiny zdravých mladých žen³¹ a mužů³² po konzumaci sójového mléka byla v rozmezí 15 – 66 %. Během těchto studií, které trvaly jeden měsíc, poklesla výtěžnost daidzeinu a genisteinu u žen o $1/3$, zatímco u mužů byla tato hodnota stálá. Pokud bylo sójové mléko podáváno krátkodobě, ženy vylučovaly více genisteinu a daidzeinu než muži³³. Tyto výsledky naznačují možnost změn v metabolismu isoflavonů u žen vystavených dlouhodobé expozici, proto autoři rozšířili záběr dlouhodobé studie i na sledování equolu³⁴. Potvrdili, že výtěžnost daidzeinu a genisteinu po 4 týdnech každodenní konzumace sóji poklesne u žen o 31 až 42 % a zároveň se zkrátí poločas absorpce a vylučování. Naproti tomu výtěžnost equolu významně vzrostla 3 až $100\times$ a jeho poločas vylučování vzrostl rovněž. Zdá se, že chronická expozice isoflavony způsobí u žen rychlejší metabolickou degradaci za vzniku neisoflavonových metabolitů (equol). Zvýšená produkce equolu, silnějšího a déle působícího estrogenu, než jsou isoflavony, může měnit a maskovat estrogenní potenci isoflavonových prekurzorů konzumovaných v potravě.

Dále se ukázalo^{35,36}, že ženy, které vylučují stolicí méně než 1 % podávaného množství isoflavonů, vylučují i močí jen 10 – 16 %. Druhá část žen vylučovala vyšší koncentrace isoflavonů jak stolicí (5 %), tak močí (27 – 32 %). Tato data podporují teorii o podstatných rozdílech v individuálních metabolismech. Přitom vylučování daidzeinu močí bylo vždy vyšší než v případě genisteinu³⁵, což by podle autorů mohlo naznačovat lepší biologickou dostupnost daidzeinu. Jiná studie rovněž sledující skupinu zdravých mužů³⁷ popisuje vyšší výtěžnost pro daidzein (62 %) než genistein (22 %). Ovšem podle těchto autorů, je to právě genistein, který je efektivněji absorbován z intestinálního traktu a zdržuje se v enterohepatální cirkulaci déle, takže může působit silněji. Důležité a zajímavé výsledky přináší práce⁴⁵, zabývající se monitorováním isoflavonů v moči, plazmě a mateřském mléku po jednorázovém a opakovaném podání sójových fazolí. Příjem fytoestrogenů vyvolal rychlou a na dávce závislou odpověď v mateřském mléku, maximální koncentrace isoflavonů bylo dosaženo za 10 – 14 hodin a eliminace byla dokončena za 2 – 4 dny. Podobně jako u moči a plazmy i v mateřském mléce probíhala eliminace ve dvou vlnách, ta druhá byla vyvolána pravděpodobně uvolněním isoflavonů z enterohepatální cirkulace. Tento proces se ostatně u metabolismu fytoestrogenů uplatňuje často³⁸. Jestliže lze o metabolismu isoflavonů říci, že je variabilní, pak toto tvrzení platí v ještě větší míře pro lignany³⁹. Muži vylučují více enterolaktonu a méně enterodiolu než ženy²⁵ a lignany jsou vylučovány také především močí, a to ve formě konjugátů, a dále stolicí ve volné, nekonjugované podobě²⁹.

4. Sója jako zdroj fytoestrogenů

Typickým zdrojem fytoestrogenů je potrava bohatá na sóju a její produkty⁴⁰. V souvislosti s nemocí šílených krav stoupá ve výživě význam sójového masa, např. jako vhodné náhražky masových karbanátků v řetězcích rychlého občerstvení. V Asii se těší značné oblibě pokrmů vyráběné fermentací sójových fazolí, jako je např. tempeh, miso nebo sójová pasta, které obsahují isoflavony hlavně ve formě volných aglykonů. Obsah fytoestrogenů v potravinách do značné míry závisí na technologickém zpracování suroviny. Někteří autoři popisují mírné snížení obsahu daidzeinu a genisteinu při mletí sójových fazolí^{5,41}, jiní podobný vliv nezaznamenali⁴¹. Při vaření se daidzein a genistein nerozkládají⁴², ale pražení fazolí vyvolává ztráty okolo 21 % pro genistein a 15 % pro daidzein. Zmrazené sójové fazole obsahovaly o 20–30 % méně genisteinu a daidzeinu ve srovnání s čerstvými a rovněž skladování syrových fazolí způsobilo⁴² pokles obsahu fytoestrogenů až o 75 %. Výroba tofu neovlivňuje obsah isoflavonů^{42,43}. Naopak při výrobě sójových párků nebo tofu jogurtu se sníží obsah fytoestrogenů až desetkrát. Odstranění tuků z práškových sójových surovin vede⁴² obvykle ke snížení obsahu isoflavonů o 30–40 %. Sójový protein izolovaný extrakcí ethanolem obsahuje jen asi 50 % fytoestrogenů původně v sóje přítomných⁴⁴.

Většina autorů se přiklání k názoru, že hlavním důvodem rozdílné koncentrace fytoestrogenů v podobných potravinách (tab. I) je nutno hledat v původu vstupní suroviny, neboť např. sójové fazole z Japonska a USA mají zhruba stejný obsah daidzeinu, ale liší se až o 27 % v obsahu genisteinu. Dalším faktorem může být doba skladování potravin v obchodech, klimatické a pěstební podmínky a vegetační zralost rostlinné suroviny.

O tom, kolik fytoestrogenů přijímá člověk s potravou, rozhodují v prvé řadě tradiční národní zvyky. Většina asijské populace konzumuje 20–80 mg genisteinu za den, zatímco příjem genisteinu v USA činí pouze 1–3 mg denně⁵³. Dalším nezanedbatelným vlivem je skladba potravy v různých dietách. Ti lidé, kteří upřednostňují makrobiotickou stravu, vylučují močí 4× více fytoestrogenů než laktovegetariáni, a ti zase asi 2× více než konzumenti jak živočišné, tak i rostlinné stravy⁵⁴.

5. Účinek fytoestrogenů na lidské zdraví

Prokazatelně nižší výskyt nádorových onemocnění prsů, vaječníků, dělohy a prostaty v asijských zemích ve srovnání se západní civilizací se zdá být způsoben spíše životním stylem než geneticky^{55,56}. A protože tradiční asijská kuchyně je bohatá na luštěniny a sóju obzvláště, vyvolalo jednoduché konstatování, že pravděpodobnost výskytu nádorů je až 20× nižší, obrovskou vlnu zájmu o isoflavony. Podobný zájem vyvolal i resveratrol v souvislosti s tzv. francouzským paradoxem, tj. nižší úmrtností na koronární a srdeční nemoci a určité druhy rakoviny ve Francii. Účinek fytoestrogenů pokrývá spektrum potenciálních mechanismů, které mohou nakonec vést k estrogennímu nebo antiestrogennímu efektu na metabolismus, a to v závislosti na řadě faktorů, jako je jejich koncentrace, koncentrace endogenních estrogenů, typ receptoru a dále na individuálních charakteristikách subjektů, jako je pohlaví, věk atd.

Tabulka I

Obsah daidzeinu a genisteinu v sóje a různých potravinách vyrobených ze sóji^a

Potravina	Daidzein [mg.kg ⁻¹]	Genistein [mg.kg ⁻¹]	Lit.
Fazole ^b	1001	1023	45
Fazole ^b	676	940	45
Fazole	1006	1382	45
Fazole ^c	848	1105	45
Fazole	1355	2676	44,47
Fazole ^c	941	1426	44,47
Mouka	654	1122	45
Mouka	412	969	44,47
Mouka	674	969	48
Mouka	789	1069	42
Mouka	658–742	837–939	43
Mouka	406	516	49
Karbanátek	26	83	44,47
Lupínky	1165	1951	50
Lupínky	419	1411	51
Lupínky	721	1222	52
Tofu	113	166	45
Tofu	238	245	44,47
Tofu	76–97	187–216	46
Tofu	644	727	49
Tofu	258	377	42
Tofu	438–1036	910–1420	47
Tofu	840	1233	47
Tempeh	405	422	44,47
Miso	1272	281	44,47
Miso	2107	227	44,47
Tofu jogurt	103	162	44,47
Parmezán	26	6	44,47
Čedar	83	62	44,47
Protein 1	89	373	44,47
Protein 2	191	640	44,47
Párky	55	129	44,47

^a Vztaženo na sušinu, ^b stejná surovina, nákup květen 93 a leden 94, ^c pražené

Fytoestrogeny jsou slabé estrogény s *in vivo* aktivitou 100 až 1000× slabší než estradiol^{57–59}, ale mohou být v těle přítomny v koncentracích až 100× vyšších než endogenní estrogény^{53,60}. Endogenní receptory existují ve dvou subtypech: dlouhou dobu známý typ ERa a v roce 1996 objevený typ ERb. Estrogenní afinita⁶¹ je pro oba subtypy různá: estradiol >> kumestrol > genistein > daidzein > biochanin A > formononetin ≈ ipriflavon pro ERa a estradiol >> genistein ≈ kumestrol > daidzein > biochanin A > formononetin pro ERb. Genistein má k receptoru ERb asi 7× vyšší afinitu⁶² než k receptoru ERa. Resveratrol má stejnou afinitu k oběma typům receptorů⁶³.

Ovšem účinek fytoestrogenů se nemusí projevovat pouze prostřednictvím estrogenních receptorů, ale mohou ovlivňovat různé enzymy, syntézu proteinů, transport vápníku, oxidaci lipidů, diferenciaci buněk nebo účinek růstových faktorů. Biosyntéza a účinky lignanů⁶⁴ a syntéza a účinky resveratrolu⁶⁵ byly nedávno předmětem referátových článků.

5.1. Kardiovaskulární onemocnění

Obecně je přijímáno tvrzení, že nižší nárůst kardiovaskulárních onemocnění asijské populace je výsledkem vysokého příjmu fytoestrogenů v potravinách⁶⁶. Ovšem je nutné připustit jisté zkreslení, protože se mohou uplatňovat i jiné vlivy, jako např. nižší obsah nasycených tuků v potravě asijských národů. Substituční hormonální léčba (HRT) znatelně snižuje riziko úmrtí žen v postmenopauze na kardiovaskulární onemocnění (až o 50 %) a rovněž snižuje i celkovou úmrtnost⁶⁷. Ovšem po zhruba 10 letech se vliv na celkovou úmrtnost ztrácí, protože vzrůstá pravděpodobnost úmrtí na rakovinu prsů vyvolanou dlouhodobým působením HRT. Několik epidemiologických studií ukazuje na snížení nebezpečí srdečních onemocnění a možnou kardioprotektivní roli fytoestrogenů pro ženy v postmenopauze^{68–70}.

Fytoestrogeny mohou mít pozitivní vliv na srdeční onemocnění i prostřednictvím snižování koncentrace lipidů a lipoproteinů v plazmě. Snižování hladiny cholesterolu u zvířat sójovými proteiny je známo už delší dobu, ale u člověka byl tento vliv popsán nedávno⁷¹. Nejvyšší účinek byl zaznamenán u těch dobrovolníků, kteří měli na začátku pokusu nejvyšší hladinu cholesterolu. To může být důvod, proč jiné studie^{72–77} vliv fytoestrogenů na snižování cholesterolu nenalezly. Ani pozitivní výsledky dalších pokusů nepřinesly jednoznačnou odpověď, neboť v několika případech byly připisány špatnému výběru a velikosti sledované skupiny osob, případně jiným složkám podávaného přípravku než isoflavonům⁷⁸.

Isoflavony sóji mohou stabilizovat⁷⁹ LDL lipoproteiny proti oxidaci, o níž se předpokládá, že probíhá v arteriích a je považována za jednu z možných příčin vzniku aterosklerosy. Kumestrol je účinnější inhibitor oxidace než 17 β -estradiol⁸⁰, zatímco isoflavony byly účinné méně. Pro kombinaci kumestrol-kvercetin byl popsán synergický efekt, který byl ale menší než pro dvojici equol-kvercetin⁸¹. Fytoestrogeny jsou v poslední době studovány i jako zachycovače volných radikálů. V popředí zájmu stojí hlavně resveratrol, účinný zejména proti hydroxylovým radikálům⁸², a genistein a equol, jejichž aktivita je srovnatelná s kvercetinem⁸¹. Synergickým efektem je také možno vysvětlit ten fakt, že komplex fenolických látek izolovaný z červeného vína měl při stejném dávkování vyšší antioxidační aktivitu než resveratrol sám⁸³. Velice nadějně závěry o přímém vlivu fytoestrogenů sóji na potlačení aterosklerosy opic přinesla studie⁸⁴, ve které preparát s isoflavony výrazně potlačil rozvoj aterosklerosy, který nebylo možno vysvětlit pouhým snížením hladiny cholesterolu v plazmě. Vezme-li se v úvahu, že isoflavony zlepšují vasodilataci u žen v postmenopauze^{75,85}, jsou jasnými kandidáty pro účinnou prevenci aterosklerosy.

5.2. Nádorová onemocnění

V populaci se západním životním stylem je nárůst onemocnění rakovinou prsů, vaječníků, dělohy a prostaty nejvyšší, zatímco u asijské populace je prokazatelně nejnižší^{56,57}. V současné době je rakovina prsů nejčastější nádorové onemocnění žen v USA a podle počtu úmrtí na onkologické choroby jí patří druhé místo⁸⁶. Význam fytoestrogenů v prevenci rakoviny prsů jasně dokumentuje studie zahrnující 144 žen s nově diagnostikovaným onemocněním, u kterých byly

plazma a moč analyzovány ještě před začátkem terapie⁸⁷. Ukázalo se, že u žen s vysokým obsahem hlavně equolu a enterolaktonu je podstatně nižší riziko vzniku a rozvinutí rakoviny prsů. Pro ženy v postmenopauze je charakteristické, že ty, které onemocněly rakovinou prsů, vylučují močí podstatně menší množství lignanů než ženy zdravé, ať už jsou jejich stravovací návyky jakékoliv^{60,88}. Nejdůležitějšími markery byly shledány právě equol a enterolakton⁶⁰. Zajímavé je, že Asiaté, kteří po přesídlení do USA přebírají místní stravovací návyky, ztrácejí svoji přirozenou ochranu proti rakovině⁸⁶ během 1–2 generací⁸⁹. U mužů se předpokládá, že fytoestrogeny mohou mít protektivní účinek proti rakovině prostaty⁹⁰. Epidemiologické studie ukazují, že výskyt rakoviny prostaty u Afroameričanů je 125× vyšší než u čínských mužů⁹¹. Pravděpodobnost vzniku rakoviny prostaty je snížena až na 50 %, je-li více než 5× týdně konzumováno tofu, jak prokázala japonská studie⁹². Asijskému muži mají vyšší hladinu fytoestrogenů v plazmě a v moči^{93,94} i v sekretu prostatických žláz⁹⁵, což je v souladu s teorií o preventivní roli těchto rostlinných látek. I muži z oblasti kolem Středozemního moře jsou více chráněni⁹⁶ proti rakovině prostaty díky lepšímu složení potravy. Rovněž pokusy *in vitro* podporují teorii, že fytoestrogeny (biochanin A, daidzein a genistein) jsou dietetické ochranné látky proti rakovině prostaty⁹⁷.

Konzumace sóji a sójových výrobků vykazuje negativní korelaci i s výskytem jiných karcinomů, než jsou nádory endokrinního systému. Tak tofu potlačuje riziko vzniku rakoviny žaludku u japonské populace⁹⁸ a rakoviny plic čínských mužů⁹⁹. Denní konzumace miso je spojena se snížením pravděpodobnosti vzniku rakoviny žaludku u japonských mužů¹⁰⁰. Číňané, jejichž roční spotřeba sójových fazolí je vyšší než 5 kg, jsou o 40 % méně ohroženi rakovinou žaludku¹⁰¹. Konzumace sójových výhonků a tofu vyšší než 9 kg za rok ve srovnání s dávkou menší než 2 kg za rok snižuje nebezpečí vzniku kolorektálního karcinomu¹⁰².

Závěry epidemiologických studií a pokusů na zvířatech nejsou bohužel jednoznačně podpořeny experimenty s buněčnými kulturami, ačkoliv je efekt *in vitro* fytoestrogenů na růst nádorových buněk zkoumán důkladně za různých experimentálních podmínek. Ve většině prací je sice popsán inhibiční efekt fytoestrogenů, ale v řadě případů je inhibice dosažena až při koncentracích řádově přesahujících fyziologické hladiny. Tak kupříkladu genistein vykazoval antiestrogenní efekt a inhiboval^{57,103} proliferaci buněk linie MCF-7 nádorů prsů *in vitro* při koncentraci vyšší než 10 μ M. Pokud se koncentrace genisteinu pohybovala ve fyziologickém rozmezí (1 nM až 10 μ M), pak naopak růst buněk MCF-7 stimuloval. Při posuzování vlivu fytoestrogenů by se nemělo zapomínat na to, že jako slabé estrogeny budou za jistých podmínek vždy stimulovaly proliferaci buněk a genovou expresi. Jako důležitá podmínka může totiž vystupovat např. přítomnost estradiolu, který je běžně nacházen u žen i mužů ve všech fázích životního cyklu. Další důležitou okolností může být zvolený typ nádorových linií použitých k experimentům. Nicméně výsledky dvou pokusů *in vivo* z poslední doby na zvířatech mohou zásadně ovlivnit orientaci dalších prací v této oblasti a možná i otevřít odlišný pohled na roli fytoestrogenů. Jestliže byl podáván genistein samicím myším, kterým byly subkutánně implantovány nádorové buňky MCF-7, pak rychlost růstu nádorů v této skupině byla vyšší než ve skupině kontrolní¹⁰³. Pokud byl genistein podáván březím samicím myším, pak urychloval po-

dobně jako estradiol ve stejné dávce pohlavní zralost mláďat-samic¹⁰⁴ a, co je velmi důležité, zvyšoval u nich počet center maligní transformace v mléčné žláze. Autoři odvozují, že expozice fytoestrogeny v těhotenství zvyšuje riziko vzniku karcinomu mléčné žlázy mezi potomky-dcerami. V porovnání s tím přineslo sledování 48 žen, které trpěly benigními i maligními tumory prsů, výsledky zcela neočekávané; fytoestrogeny stimulovaly proliferaci zdravých buněk tkáně mléčné žlázy¹⁰⁵.

Účinky fytoestrogenů na různé karcinomy mohou být připsány řadě mechanismů. Jednak se jistě uplatňuje jak jejich estrogenní aktivita, tak antiestrogenní, která převažuje za přítomnosti endogenních estrogenů. Konečně inhibice buněk MCF-7 vysokými koncentracemi fytoestrogenů je pravděpodobně zcela nezávislá na interakci s ER¹⁰⁶. V těchto i dalších případech se klíčovým mechanismem stává inhibice enzymů, které jsou spojeny s růstem buněk (ornithindekarboxylasa, proteintyrosinkinasa a DNA-topoisomerasy), nebo enzymů řídících produkci estronu z androgenů (aromatasa).

Isoflavony, speciálně genistein, jsou inhibitory^{107,108} proteintyrosinkinasy. Genistein dále snižuje růst, indukuje diferenciaci a inhibuje proliferaci leukemických buněk a melanomů^{109,110}. Biochanin A a genistein mají cytotoxický efekt na karcinom žaludku a tenkého střeva¹¹¹ a podle nejnovějších výsledků se pravděpodobně při inhibici kolorektálního karcinomu uplatňuje i mechanismus aktivace enzymů, jako je NADPH-chinonreduktasa, která chrání buňky proti mutagennímu a karcinogennímu účinku volných radikálů. Pořadí aktivity bylo: enterolakton>genistein>>biochanin A>>kumestrol¹¹². DNA-topoisomerasy katalyzují topologické změny v DNA a jsou nezbytné pro replikaci DNA. Genistein inhibuje¹¹³ jak topoisomerasu I, tak II v koncentracích okolo 7–20 μM. Aromatasa katalyzuje rychlost určující stupeň v syntéze estrogenů, a proto jsou její inhibitory schopny modifikovat hladinu estrogenů u žen. Isoflavony obecně jsou slabšími inhibitory aromatasy než flavony¹¹⁴ a jejich aktivita je různá v závislosti na zdroji enzymu.

Za 20 let mapování výskytu nádorových onemocnění je vidět markantní nárůst kolorektálního karcinomu bez rozdílu pohlaví, karcinomu prostaty u mužů a karcinomu prsů a dělohy u žen. Tento trend je dáván do přímé souvislosti se zvyšováním podílu tuků a masa v potravě a tvoří základ strategie prevence rakoviny cestou zvyšování denní konzumace zeleniny, ovoce a vlákniny.

5.3. Osteoporosa, symptomy menopausy, angiogeneze a metabolismus estrogenů

Postupné řídnutí kostí je přirozeným fyziologickým projevem stárí a souvisí se snížením produkce steroidů v organismu. Protože četnost zlomenin krčků či zápěstí je nižší v Asii než ve většině západních zemí¹¹⁵, opět to je konzumace fytoestrogenů, na kterou je kladen důraz. Riziko postmenopausální osteoporosy žen snižuje hormonální léčba^{116,117}, ačkoliv není doposud jasné, jakým mechanismem. Proto se předpokládá, že fytoestrogeny jako slabé estrogeny by mohly působit preventivně proti osteoporose. Nepřímý důkaz této teorii poskytuje i fakt, že ipriflavin v denní dávce 200–600 mg zvyšuje hmotnost kostí¹¹⁷. Doposud publikované práce zatím nepřinášejí příliš optimistické závěry. Sledování 67 holandských

žen v postmenopauze po dobu 10 let nepotvrdilo preventivní efekt nízké dlouhodobé expozice fytoestrogeny¹¹⁸. Fytoestrogeny ovšem mohou přispívat k prevenci osteoporosy i jinými cestami než interakcemi s ER. Předně jsou potraviny ze sóji dobrým zdrojem vápníku a dále mohou isoflavony až o 50 % snižovat ztráty vápníku vylučovaného močí¹¹⁹. Pro jednoznačné konstatování o vlivu fytoestrogenů na osteoporosu zatím chybí dostatek experimentálních údajů. Bylo by nebezpečné odvozovat jejich účinky pouze na základě aktivity ipriflavonu, jehož jedním metabolitem je daidzein¹²⁰. Navíc terapeuticky účinné dávky ipriflavonu mnohonásobně převyšují reálnou hladinu isoflavinů dosažitelnou pouhou konzumací potravin ze sóji.

Nástup menopausy doprovází řada symptomů, z nichž návaly horka jsou nejméně příjemné a jsou popisovány jako méně časté u japonských žen než u kanadských¹²¹ a současně pouze 4 % japonských žen v postmenopauze užívá HRT ve srovnání se 30 % žen v USA (cit.¹²²). Ačkoliv mohou být rozdíly v symptomech menopausy žen různých etnik vyvolány různými faktory, někteří odborníci¹²³ je přičítají dietetickým fytoestrogenům. Prozatím bylo publikováno pouze několik prací^{124–126} sledujících četnost návalů v závislosti na podávání fytoestrogenů a ani jedna z nich jednoznačně pozitivní vliv nepotvrzuje.

Fytoestrogeny jsou schopny potlačit angiogenezi¹²⁷, která se projevuje abnormálním bujením krevních cév, nejčastěji kapilár v nose, plicích, gastrointestinálním traktu nebo na kůži. Z tohoto pohledu se jeví jako perspektivní genistein, u něhož byl prokázán zpomalující efekt na růst endothelu buněk krevních kapilár izolovaných z hovězího mozku¹²⁸.

Obecně je přijímán názor, že čím je delší doba, po kterou je žena vystavena účinku estrogenů, tím je vyšší pravděpodobnost vzniku rakoviny prsů, vaječníků a dělohy. Protože jen asi 5 % všech případů rakoviny je možno přisoudit genetickým dispozicím, mohla by mít protektivní účinek dieta cestou snížení koncentrace endogenních estrogenů, neboť hladina estrogenů je u pacientek s rakovinou prsů ve srovnání se zdravou populací vyšší¹²⁹. Zatím jen relativně málo prací se zabývalo vlivem fytoestrogenů na hladinu endogenních estrogenů a hormonů, a to ještě nejsou jejich výsledky zcela konzistentní. Zatímco jedni autoři potvrzují po konzumaci sójových isoflavinů¹³⁰ pokles koncentrace estradiolu, jiní nalezli¹³¹ naopak nárůst. Závěry sledování¹³² 12 žen v premenopauze po dobu 100 dnů lze považovat za velice závažné. Podání isoflavinů snížilo koncentraci vylučovaného estradiolu, estronu a estriolu stejně jako jejich genotoxických metabolitů 16α-hydroxyestronu, 4-hydroxyestrenonu a 4-hydroxyestradiolu. Výsledky ukazují, že isoflavony sóji skutečně potlačují syntézu estrogenů a mění jejich metabolismus směrem od genotoxických metabolitů k metabolitům inaktivním.

6. Závěr

Přes obrovský zájem o fytoestrogeny a jejich účinky na lidské zdraví (47 referátových článků v roce 2000, 46 do listopadu 2001) stále ještě existují nezdopovězené otázky a nové výsledky bádání přinášejí nové problémy. I když zatím nelze doporučit nějakou optimální denní dávku fytoestrogenů, zdá se, že většinový názor odborníků je, že jejich příznivý vliv na lidské zdraví převažuje nad možnými riziky.

Tato práce je součástí řešení výzkumného záměru MŠMT č. 223300004.

LITERATURA

- Farnsworth N. R., Bingel A. S., Cordell G. A., Crane F. A., Fond H. H. S.: J. Pharmacol. Sci. 64, 717 (1975).
- Zava D. T., Blen M., Duwe G.: Environ. Health Perspect. Suppl. 105, 637 (1997).
- Moravcová J., Vääntinen K.: Hort. Sci. 26, 63 (1999).
- Liggins J., Bluck L. J. C., Runswick S., Atkinson C., Coward W. A., Bingham S. A.: J. Nutr. Biochem. 11, 326 (2000).
- Kudou S., Fleury Y., Welti D., Mangnoloto D., Uchida T., Kitamura K., Okubo K.: Agric. Biol. Chem. 55, 2227 (1991).
- Bradbury R. B., White D. E.: Vitam. Horm. 12, 207 (1954).
- Axelsson M., Sjövall J., Gustafsson B. E., Setchell K. D. R.: Nature 298, 659 (1982).
- Setchell K. D. R., Lawson A. M., Mitchell F. L., Adlercreutz H., Kirk D. N.: Nature 587, 740 (1980).
- Adlercreutz H., ve sborníku: *COST Action 92, Diet. Fibre Ferment. Colon Proc. Workshop* (Maelki Y., Cummings J. H., ed.), str. 324, Luxembourg 1996; Chem. Abstr. 126, 376698 (1997).
- Mazur W. M., Uehara M., Wähälä K., Adlercreutz H.: Br. J. Nutr. 83, 381 (2000).
- Wong E., v knize: *The Flavonoids* (Harbourne J. B., Mabry T. J., Mahry H., ed.), str. 780. Chapman Hall, London 1975.
- Kalač P., Míka V., v knize: *Přírodní škodlivé látky v rostlinných krmivech*, str. 99. Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha 1997.
- Franke A. A., Custer L. J., Cerna C. M., Narala K. N.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 208, 18 (1995).
- Nikfardjam M. P., Schmitt K., Ruhl E. H., Patz C.-D., Dietrich H.: Dtsch. Lebensm.-Rundsch. 96, 319 (2000).
- Kelly G. E., Nelson C., Waring M. A., Joannou G. E., Reeder A. Y.: Clin. Chim. Acta 223, 9 (1993).
- Adlercreutz H., Van der Wildt J., Kinzel J., Attala H., Wähälä K., Mäkelä T., Hase T., Fotsis T.: J. Steroid. Biochem. Molec. Biol. 52, 97 (1995).
- Xu X., Harris K. S., Wang H. J., Murphy P. A., Hendrich S.: J. Nutr. 125, 97 (1995).
- De Santi C., Pietrabissa A., Mosca F., Pacifici G. M.: Xenobiotica 30, 1047 (2000).
- Joannou G. E., Kelly G. E., Reeder A. Y., Waring M., Nelson C.: J. Steroid. Biochem. Molec. Biol. 54, 1677 (1995).
- Setchell K. D. R., Borriello S. P., Hulme P., Kirk D. N., Axelsson M.: Am. J. Clin. Nutr. 40, 569 (1984).
- Kelly G. E., Nelson C., Waring M. A., Joannou G. E., Reeder A. Y.: Clin. Chim. Acta 223, 9 (1993).
- Hanley A. B., Oehlschlager S. L., McBride J., Popping B., Smith R., Damant A., Barnes K., Fewtrell M.: Spec. Publ. R. Soc. Chem. 248, 146 (2000).
- Coldham N. G., Howells L. C., Santi A., Montesissa C., Langlais C., King L. J.: J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 70, 169 (1999).
- Borriello S. P., Setchell K. D. R., Axelsson M., Lawson A. M.: J. Appl. Bacteriol. 58, 37 (1985).
- Kirkman L. M., Lampe J. W., Campbell D. R., Martin M. C., Slavin J. L.: Nutr. Cancer 24, 1 (1995).
- Yueh T. L., Chu H. Y.: Sci. Sin. 20, 513 (1977).
- Coldham N. G., Sauer M. J.: Toxicol. Appl. Pharmacol. 164, 206 (2000).
- Janning P., Schuhmacher U. S., Upmeyer A., Diel O., Michna H., Degen G. H., Bolt H. M.: Arch. Toxicol. 74, 421 (2000).
- Hutchins A. M., Lampe J. W., Martini M. C., Campbell D. R., Slavin J. L.: J. Am. Diet Assoc. 95, 769 (1995).
- Hutchins A. M., Slavin J. L., Lampe J. W.: J. Am. Diet Assoc. 95, 545 (1995).
- Lu L. J., Anderson K. E., Grady J. J., Nagamani M.: Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 5, 63 (1996).
- Lu L. J., Grady J. J., Marshall M. V., Ramanujam V. M., Anderson K. E.: Nutr. Cancer 24, 311 (1995).
- Lu L. J., Broemeling L. D., Marshall M. V., Ramanujam V. M.: Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 4, 497 (1995).
- Lu L. J., Sin S. N., Grady J. J., Nagamani M., Anderson K. E.: Nutr. Cancer 26, 289 (1996).
- Xu X., Wang H. J., Murphy P. A., Cook L., Hendrich S.: J. Nutr. 124, 825 (1994).
- Xu X., Harris K. S., Wang H. J., Murphy P. A., Hendrich S.: J. Nutr. 125, 307 (1995).
- King R. A., Bursill D. B.: Am. J. Clin. Nutr. 67, 867 (1998).
- Gamache P. H., Acworth I. N.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 217, 274 (1998).
- Gamache P. H., Acworth I. N.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 217, 274 (1998).
- Barnes S.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 217, 386 (1998).
- Eldridge A. C., Kwolek W. F.: J. Agric. Food Chem. 31, 394 (1983).
- Franke A. A., Custer L. J., Cerna C. M., Narala K. K.: J. Agric. Food Chem. 42, 1905 (1994).
- Coward L., Barnes N. C., Setchell K. D. R., Barnes S.: J. Agric. Food Chem. 41, 1961 (1993).
- Wang H.-J., Murphy D. A.: J. Agric. Food Chem. 42, 1666 (1994).
- Franke A. A., Custer L. J., Wang W., Shi C. Y.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 217, 263 (1998).
- Dwyer J. T., Goldin B. R., Saul N., Gualtieri L., Barakat S., Adlercreutz H.: J. Am. Diet Assoc. 94, 739 (1994).
- Wang H.-J., Murphy P. A.: J. Agric. Food Chem. 42, 1674 (1994).
- Mazur W., Fotsis T., Wähälä K., Ojala S., Salakka A., Adlercreutz H.: Anal. Biochem. 233, 169 (1996).
- Vääntinen K., Moravcová J.: Czech J. Food Sci. 17, 61 (1999).
- Kitada Y., Ueda Y., Yamamoto M., Ishikawa M., Nakazawa H., Fujita M.: J. Chromatogr. 366, 403 (1986).
- Seo A., Morr C. V.: J. Agric. Food Chem. 32, 530 (1984).
- Eldridge A. C., Kwolek W. F.: J. Agric. Food Chem. 31, 394 (1983).
- Barnes S., Peterson T. G., Coward L.: J. Cell. Biochem. 22, 181 (1995).
- Adlercreutz H., Fotsis T., Bannwart C., Wähälä K., Mäkelä T., Brunow G., Hase T.: J. Steroid. Biochem. 24, 289 (1986).

55. Parkin D. M.: Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 25, 1917 (1989).
56. Ziegler R. G., Hoover R. N., Like M. C.: J. Natl. Cancer Inst. 85, 1819 (1993).
57. Zava D. T., Duwe G.: Nutr. Cancer 27, 31 (1997).
58. Santell R. C., Cheng Y. C., Nair M. G., Helferich W. G.: J. Nutr. 127, 263 (1997).
59. Miksicek R. J.: J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. 49, 153 (1994).
60. Adlercreutz H., Fotsis T., Heikkinen R., Markkanen H., Watanabe S.: Lancet 342, 1209 (1993).
61. Kuiper G. G. J. M., Lemmen J. G., Carlsson B., Corton J. C., Safe S. H., VanDerSaag P. T., VanDerBurg B., Gustafsson J.-A.: Endocrinology 139, 4252 (1998).
62. Kuiper G. G. J. M., Carlsson B., Grandien K., Enmark E., Haggblad J., Nilsson S., Gustafsson J.-A.: Endocrinology 138, 863 (1997).
63. Bowers J. L., Zylmenkov V. V., Jernigan S. C., Klinge C. M.: Endocrinology 141, 3657 (2000).
64. Slanina J.: Chem. Listy 94, 11 (2000).
65. Šmidrkal J., Filip V., Melzoch K., Hanzlíková I., Bučková D., Křisa B.: Chem. Listy 95, 602 (2001).
66. Keys A., Menotti A., Aravanis C.: Prev. Med. 13, 141 (1984).
67. Grodstein F., Stampfer M. J., Colditz G. A., Willett W. C., Manson J. E., Joffe M., Rosner B., Fuchs C., Hankinson S. E., Hunter D. J., Hennekens C. H., Speizer F. E.: N. Engl. J. Med. 336, 1769 (1997).
68. Chae C. V., Ridker P. M., Manson J. E.: Thromb. Haemost. 78, 770 (1997).
69. Stampfer M. J., Colditz G. A., Willett W. C.: N. Engl. J. Med. 325, 756 (1991).
70. Gilligan D. M., Badar D. M., Panza J. A., Quyyumi A. A., Cannon III R. O.: Am. J. Cardiol. 75, 264 (1995).
71. Anderson J. W., Johnstone B. M., Cook-Newell M. E.: N. Engl. J. Med. 333, 276 (1995).
72. Carroll K. K.: J. Am. Diet Assoc. 91, 820 (1991).
73. Hodgson J. M., Puddey I. B., Beilin L. J., Mori T. A., Croft K. D.: J. Nutr. 128, 728 (1998).
74. Gooderham M. J., Adlercreutz H., Ojala S. T., Wähälä K., Holub B. J.: J. Nutr. 126, 2000 (1996).
75. Nestel P. J., Yamashita T., Sasahara T., Pomeroy S., Dart E., Komesaroff P., Owen A., Abbey H.: Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 17, 3392 (1997).
76. Hodgson J. M., Puddey I. B., Beilin L. J., Mori T. A.: J. Nutr. 128, 728 (1998).
77. Howes J. B., Sullivan D., Lai N., Nestel P. Pomeroy S., West L., Eden J. A., Howes L. G.: Atherosclerosis 152, 143 (2000).
78. Cassidy A., Bingham S., Setchell K.: Br. J. Nutr. 74, 587 (1995).
79. Takkanen M. J., Wähälä K., Ojala S., Vihma V., Adlercreutz H.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95, 3106 (1998).
80. Wiseman H., O'Reilly J.: Biochem. Soc. Trans. 25, 107 (1997).
81. Wiseman H., O'Reilly J.: Biochem. Soc. Trans. 25, 108 (1997).
82. Sato M., Ray P. S., Maulik G., Maulik N., Engelman R. M., Bertelli A. A. E., Bertelli A. D., Dipak K.: J. Cardiovasc. Pharmacol. 35, 263 (2000).
83. Tedesco I., Russo M., Russo P., Iacomino G., Russo G. L., Carraturo A., Faruolo C., Moio L., Palumbo R.: J. Nutr. Biochem. 11, 114 (2000).
84. Anthony M. S., Clarkson T. B., Bullock B. C., Wagner J. D.: Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 17, 2524 (1997).
85. Lieberman E. H., Gerhard M. D., Uehata A., Walsh B. W., Selwyn A. P., Gauz P.: Ann. Intern. Med. 121, 936 (1994).
86. Lamartiniere C. A., Murrill W. B., Manzollillo P. A., Zhang J.-X., Barnes S., Zhang X., Wei H., Brown N. M.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 217, 358 (1998).
87. Ingram O., Sanders K., Kolybaba M., Lopez D.: Lancet 350, 990 (1997).
88. Adlercreutz H., Fotsis T., Bannwart C.: J. Steroid. Biochem. 25, 791 (1986).
89. Kolonel L. W., Hankin J. H., Nomura A. M. Y., v knize: *Nutrition and Cancer* (Hayashi Y., Nagao M., Sugimura T., Takayama S., Tomatis L., Wattenberg L. W., Wogan G. N., ed.), str. 29. Japanese Science Society Press, Tokyo 1986.
90. Barnes S., Peterson T. G., Coward L.: J. Cell. Biochem. 22, 181 (1995).
91. Miller S. G., v knize: *Multidisciplinary Analysis of Controversies in the Management of Prostatic Cancer* (Coffey D. S., Resnick M. I., Dorr F. A., Karr J. P., ed.), str. 17. Plenum Press, New York 1988.
92. Severson R. K., Nomura A. M. Y., Grove J. S., Stemmerman G. N.: Cancer. Res. 49, 1857 (1989).
93. Adlercreutz H., Honjo H., Higashi A.: Am. J. Clin. Nutr. 54, 1093 (1991).
94. Adlercreutz H., Markkanen H., Watanabe S.: Lancet 342, 1029 (1993).
95. Morton M. S., Matos-Ferreira A., Abranches-Monteiro L., Correia R., Blacklock N., Chan P. S. F., Cheng C., Lloyd S., Wu C.-P., Griffiths K.: Cancer Lett. 114, 145 (1997).
96. Morton M. S., Chan P. S. F., Cheng C., Blacklock N., Matos-Ferreira A., Abranches-Monteiro L., Correia R., Lloyd S., Griffiths K.: Prostate 32, 122 (1997).
97. Hempstock J., Kavanagh J. P., George N. J. R.: Br. J. Urol. 82, 560 (1998).
98. Haenszel W., Kurihara M., Segi M., Lee R. K. C.: J. Natl. Cancer Inst. 49, 969 (1972).
99. Swanson C. A., Mao B. L., Li J. Y., Lubin J. H., Yao S. X.: Inst. J. Cancer 50, 876 (1992).
100. Hirayama T.: Nutr. Cancer 3, 223 (1982).
101. You W. C., Blot W. J., Chang Y. S., Ershow A. G., Yang Z. T.: Cancer Res. 48, 3518 (1988).
102. Hu J., Liu Y., Yu Y., Zao T., Liu S.: Int. J. Epidemiol. 20, 362 (1991).
103. Hsieh C.-Y., Santell R. C., Haslam S. Z., Helferich W. G.: Cancer Res. 58, 3833 (1998).
104. Hilakivi-Clarke L., Cho E., Clarke R.: Oncol. Rep. 5, 609 (1998).
105. McMichael-Phillips D. F., Harding C., Morton M., Roberts S. A., Howell A., Potten C. S., Bundred N. J.: Am. J. Clin. Nutr. 68, 1431 (1998).
106. Wang W., Peterson G., Barnes S.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 179, 661 (1991).
107. Chang C. J., Geahleen R.L.: J. Nat. Prod. 55, 1529 (1992).
108. Akiyama T., Ishida J., Nakagawa S., Ogawara H., Watanabe S.-I., Itoh N., Shibuya M., Fukami Y.: J. Biol. Chem. 262, 5592 (1987).
109. Constantinou A., Huberman E.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 208, 109 (1995).

110. Constantinou A., Kiguchi K., Huberman E.: *Cancer Res.* 50, 2618 (1990).
111. Yanagihara K., Ito A., Toge T., Numoto M.: *Cancer Res.* 53, 5815 (1993).
112. Wang W., Liu Q., Higuchi C. M., Chen H.: *Biochem. Pharmacol.* 56, 189 (1998).
113. Markovits J., Linassier C., Fosse P., Couprie J., Pierre J.: *Cancer Res.* 49, 5111 (1989).
114. Kao Y.-C., Zhou C., Sherman M., Laughton C. A., Chen S.: *Environ. Health Perspect.* 106, 85 (1998).
115. Kao D. C., P'eng F. K.: *Chin. Med. J.* 55, 209 (1995); převzato Tham D. M., Gardner C. D., Haskell W. L.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83, 2223 (1998).
116. Ettinger B.: *Obstet. Gynecol.* 72, 12 (1988).
117. Heikkinen A. M., Pariainen M., Miskanen L.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82, 2476 (1998).
118. Kardinaal A. F. M., Morton M. S., Bruggemann-Rotgans I. E. M., van Beresteijn E. C. H.: *Eur. J. Clin. Nutr.* 52, 850 (1998).
119. Breslau N. A., Brinkley L., Hill K. D., Pak C. Y. C.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 66, 140 (1988).
120. Brandi M. L.: *Bone Miner.* 19, 3 (1992); převzato z cit.⁴⁰.
121. Lock M.: *Lancet* 337, 1270 (1991).
122. Adlercreutz H., Gorbach S., Goldin B.: *Lancet* 339, 1233 (1992).
123. Adlercreutz H., Gorbach S., Goldin B.: *Lancet* 339, 1233 (1992).
124. Chung T. K. H., Yip S. K., Lam P., Chang A. M. Z., Haines C. J.: *Maturitas* 25, 115 (1996).
125. Murkies A. L., Lombard C., Strauss B. J., Wilcox G., Burger H. G., Morton M. S.: *Maturitas* 21, 189 (1995).
126. Albertazzi P., Pansini F., Bottazzi M., Bonaccorsi G., De Aloysio D., Morton M. S.: *Obstet. Gynecol.* 94, 229 (1999).
127. Fotsis T., Pepper M., Adlercreutz H., Flerischmann G., Hase T., Montesano R., Schweigert L.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 2690 (1993).
128. Molteni A., Brizio-Molteni L., Persky V.: *J. Nutr.* 125, 751 (1995).
129. Key T. J. A., Pike M. C.: *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 24, 29 (1988).
130. Nagata C., Kabuto M., Kurisa Y., Shimizu H.: *Nutr. Cancer* 29, 228 (1997).
131. Cassidy A., Bingham S., Setchell K. D. R.: *Am. J. Clin. Nutr.* 60, 333 (1994).
132. Xu X., Duncan A. M., Kruz B. E., Kurzer M. S.: *Cancer Epidemiol., Biomarkers Prev.* 7, 1101 (1998).

J. Moravcová^a and T. Kleinová^b (^a*Department of Chemistry of Natural Compounds, Institute of Chemical Technology Prague,* ^b*Research Institute of Animal Production, Prague*): **Phytoestrogens in Nutrition – Do They Bring Benefit or Involve Risk?**

Phytoestrogens are secondary metabolites of plants displaying both estrogenic and antiestrogenic activity. Moreover, they can also act through other estrogen-independent mechanisms. Soya is their main source in human nutrition. Population-based studies have suggested that consumption of a phytoestrogen-rich diet protects from civilization diseases. The evaluation of their beneficial effects is rather confusing due to individual sensitivity of humans to biological effects of phytoestrogens.

NÁVRAT HOUBY, JEŽ DALA VZNIKOUT JMÉNU TRICHOHECENY

MARTIN ŽABKA^a a ALEXANDR JEGOROV^b

^aZemědělská fakulta, Jihočeská univerzita, Studentská 13, 370 05 České Budějovice, ^bIVAX CR a.s., Výzkumná jednotka, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice
e-mail: mزابka@centrum.cz, alexandr_jegorov@ivax-cr.com

Došlo dne 14.III.2002

Klíčová slova: mykotoxiny, trichotheceny, roseotoxiny, destruxiny

Obsah

1. Úvod
2. Výskyt mykotoxinů
3. Trichotheceny
4. Roseotoxiny a destruxiny
5. Závěr

1. Úvod

Aktuálním trendem v oblasti výroby zemědělských komodit a následně potravin se stala produkce kvalitních, a především zdravotně nezávadných produktů. Tento trend do značné míry souvisí i se sledováním obsahu exogenních toxických látek, mezi nimiž důležité místo bezesporu zaujímají mykotoxiny.

Po 11. září 2001 získalo téma mykotoxinů i jinou neblahou aktuálnost v souvislosti s jejich možným zneužitím k teroristickým cílům. Jednou z doposud nejvýznamnějších skupin mykotoxinů jsou trichotheceny¹. S instrukcemi, jak se zachovat při jejich zneužití, se dnes lze setkat na webových stránkách četných amerických nebo britských úřadů. Takovéto varování rozhodně není liché, neboť z válečné historie jsou známy případy užití substance zvané „žlutý déšť“, jejíž základ byl tvořen některými trichotheceny a jež byla pravděpodobně užita při konfliktech v Laosu, Kambodži a následně i v Afghánistánu². I když jsou tyto látky předmětem mezinárodní konvence o biologických zbraních (The Biological Weapons Convention), existuje i podezření na jejich použití ve válce v Koreji a Perském zálivu^{3–7}. Přibližně 50leté historii objevení účinku trichothecenů a speciálně houbě, jež dala vzniknout jménu této skupiny látek, je věnován tento článek.

2. Výskyt mykotoxinů

Mykotoxiny jsou toxické sekundární metabolity mikroskopických vláknitých hub, vyvolávající různé toxické syndromy nazývané souhrnně mykotoxikózy. Mykotoxiny se vyskytují na všech úrovních potravního řetězce⁸, ke kontaminaci

může docházet už v době pěstování na poli, stejně tak i během skladování⁹. Bennet (1987) (cit.¹⁰) definoval mykotoxiny jako přírodní produkty hub, které evokují toxickou odezvu organismu už i ve velice malých koncentracích; z tohoto důvodu je jakákoliv kontaminace toxinogenními houbami potenciálně značně nebezpečná. Nejvíce známé mykotoxinogenní druhy náleží do rodů *Aspergillus*, *Penicillium* a *Fusarium*¹¹, nicméně v poslední době vystupují do popředí i další zástupci, jako jsou rody *Alternaria*, *Paecilomyces*, *Rhizopus*, *Trichoderma* a *Trichothecium*. Všechny tyto houby se obecně vyskytují v půdě a ve formě spor pak běžně ve vzduchu¹². Mezi významné skupiny mykotoxinů jsou řazeny: aflatoxiny, trichotheceny, námelové alkaloidy, zearalenony, ochratoxiny, sterigmatocystin, cyklopiazonová a peniciliová kyselina, patulin, citrinin, rubratoxiny, fumonisiny a tremorgeny.

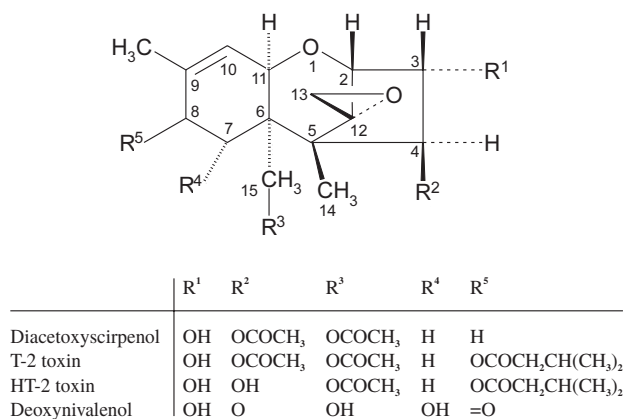
Důsledky expozice organismu mykotoxinům jsou známy u lidí i zvířat už z dávné minulosti, kdy byly některé otravy (ergotismus) živnou půdou pro šíření náboženských pověr, stejně tak z minulosti poměrně nedávné, např. úmrtí 17 000 lidí v důsledku alimentární toxické aleukie (ATA), vyvolané požitím kontaminovaného obilí za II. světové války v bývalém Sovětském svazu^{8,13}. Konečně i v dnešní době je škodlivý vliv mykotoxinů na populaci patrný⁶, a to hlavně v rozvojových zemích¹⁴.

3. Trichotheceny

Trichotheceny jsou jako skupina sekundárních metabolitů hub systematicky popisovány již od roku 1948, kdy byl na základě svých inhibičních vlastností^{15–18} objeven Freemanem a Morrissonem v houbách *Trichothecium roseum* (pers Fr.) Link¹⁹ první zástupce této skupiny nazvaný trichothecin²⁰. Producenti trichothecenů tvoří dnes již poměrně široké spektrum zástupců²¹ a od té doby bylo objeveno dalších asi 170 trichothecenů^{22,23}.

Z hlediska praktického výskytu trichothecenů v kontaminovaných potravinách je známo, že hlavním kontaminantem bývá deoxynivalenol. Jde naštěstí o jeden z méně toxických trichothecenů⁸. Hygienické limity v ČR pro tento mykotoxin jsou stanoveny pro obilí, rýži a kukuřici 2 mg.kg⁻¹ a pro mouku 1 mg.kg⁻¹. Pro jiné trichotheceny nejsou v ČR zákonné limity určeny²⁴.

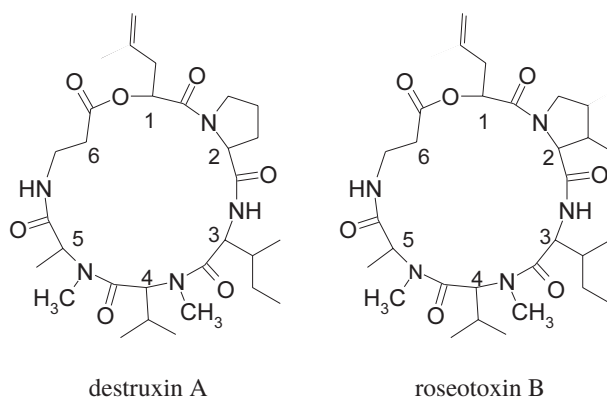
Trichotheceny jsou většinou charakterizovány jako tricyklické seskviterpeny se dvěma šestičlennými a jedním pětičlenným kruhem⁸. Většina z nich má dvojnou vazbu v poloze 9,10 a obsahuje epoxyskupinu v poloze 12,13 (cit.⁹). Mohou být rozděleny do čtyř typů (A, B, C, a D). Typ A se vyznačuje nepřítomností oxoskupiny v poloze 8 a příkladem je vysoce toxický HT-2 a T-2 toxin. Typ B je význačný přítomností oxoskupiny na C-8 a příkladem by mohl být deoxynivalenol (DON), nazývaný též vomitoxin. Skupina trichothecenů typu C je charakteristická další epoxyskupinou v poloze 7,8 nebo i 9,10 a lze sem zařadit například krotocin. Typ D obsahuje makrocycklus mezi C-4 a C-15 s několika esterovými vazbami, jehož příkladem je verukarin A (cit.^{8,9}).

Obr. 1. Struktura trichothecenů¹

Kontaminace organismu trichotheceny má za následek širokou paletu projevů. Vesměs jde o silné inhibitory syntézy proteinů a DNA (cit.¹). Při vystavení organismu účinkům trichothecenů může docházet k rozličným syndromům, například ke snižování příjmu nebo totálnímu odmítání potravy, k podráždění kůže až k dermálním nekrotickým, zvracení, průjmům a krvácivosti. Trichotheceny jsou popsány i jako imunosupresory^{25–29}. Bez výjimky všechny trichotheceny vykazují větší či menší stupeň toxicity pro živočichy, vykazují i insekticidní efekt^{1,30}. Byla popsána i fytotoxická aktivita^{1,31}. Toxicita je vysvětlována především přítomností epoxyskupiny³². V minulosti se trichotheceny staly pro svou toxicitu předmětem zájmu vojenského výzkumu, který následně odhalil u některých zástupců (např. T-2 toxin) vlastnosti splňující předpoklady pro jejich bojové využití. Jedná se například o schopnost vyvolat poškození kůže a očí už od dávky několika ng–μg, vážné poškození nervové soustavy, respirační, gastrointestinální a hematologickou toxicitu spojenou s mnohostetností způsobů průniku do organismu^{33–35}.

Trichothecium roseum je celosvětově rozšířená patogenní houba³⁶ hojně se vyskytující na různém ovoci³⁷ i lískových oříšcích³⁸, v našich podmínkách pak především na jablkách³⁹. Trichotheceny izolované z hub *Trichothecium roseum* (trichothecin) nebo *Stachybotrys cylindrospora*⁴⁰ vykazovaly antifungální aktivitu spojenou s inhibicí konkurenčních hub^{20,41}. Farmakologicky zajímavou fungicidní aktivitu, která není doprovázena cytotoxickými účinky, vykazují např. trichotheceny izolované z houby *Trichoderma harzianum*⁴². Trichotheceny překvapivě nevykazují žádnou nebo téměř žádnou aktivitu vůči různým bakteriím nebo kvasinkám^{42,43}. Byly u nich však zjištěny antivirální účinky, a to jak u rostlinných virů (tobacco necrosis virus, TNV)⁴⁴, tak virů účinných u člověka (Epstein-Barr virus EBV-EA, Herpes simplex virus)^{45–47}. Velmi zajímavá je i velmi vysoká aktivita některých trichothecenů na malárii⁴⁸. Na skupinu trichothecenů se tedy v celku nelze dívat pouze jako na toxiny, ale mezi různými účinky těchto látek lze nalézt i medicínsky využitelné aktivity.

Analýza trichothecenů je dnes již rutinní záležitostí. Podkladem pro většinu současných metod je metoda, kterou zavedl Scott (1970) (cit.⁴⁹). Dodnes se tato metoda v různých modifikacích uplatňuje při detekci velkého množství mykotoxinů. Jako další metodu pro stanovení lze zmínit např. detekci

Obr. 2. Struktura destruxinu A a roseotoxinu B (cit.⁶¹)

destruxin A: ¹ 2-hydroxypent-4-enová kyselina, ² Pro, ³ Ile, ⁴ MeVal, ⁵ MeAla, ⁶ β-Ala
 roseotoxin B: ¹ 2-hydroxypent-4-enová kyselina, ² 3-Me-Pro, ³ Ile, ⁴ MeVal, ⁵ MeAla, ⁶ β-Ala

pomocí kultur na agarových plotnách, kterou představil Filtenborg a Frisvad (1980) (cit.⁵⁰). Základem metod je dnes užití TLC, HPLC nebo pokročilých metod GC-MS nebo HPLC-MS. Navíc jsou komerčně používány i metody založené na kitech využívajících imunodetekci nebo afinitní chromatografii⁵¹.

4. Roseotoxiny a destruxiny

Trichothecium roseum produkuje jak již zmíněné trichotheceny, tak méně známé roseotoxiny a destruxiny⁵². Roseotoxiny a destruxiny po chemické stránce náleží do skupiny cyklických depsipeptidů⁵³. Termín cyklické depsipeptidy poprvé užil Shemyakin (1960) (cit.⁵⁴) a představuje cyklické peptidy skládající se z aminokyselin a hydroxykyselin. Peptidová vazba je tudíž v místech napojení hydroxykyseliny nahrazena esterovou vazbou. O cyklických depsipeptidech lze hovořit jako o široké skupině látek s mnoha různými biologickými účinky. Byly u nich objeveny například insekticidní^{55,56} nebo protivirové⁵⁷ účinky a také např. cytotoxicita k leukemickým buňkám⁵⁸.

Roseotoxiny jsou skupinou mykotoxinů originálně produkováných pouze patogenní houbou *Trichothecium roseum*⁵². Roseotoxiny jsou složeny z pěti aminokyselin a jedné hydroxykyseliny a vyznačují se přítomností neobvyklé aminokyseliny *trans*-3-methylprolinu. Popsány byly roseotoxiny A, B a C, které byly pojmenovány dle retence na silikagelu^{52,53,59}, a roseotoxin S lišící se počtem hydroxykyselin v cyklu⁶⁰.

Destruxiny jsou roseotoxinům příbuzné hexadepsipeptidy^{61,62} obsahující jednu α-hydroxykyselinu. Jedinou odlišností je substituce *trans*-3-methylprolinu u roseotoxinů prolinem u destruxinů⁶³. Destruxiny jsou produkovány houbou *T. roseum* a několika dalšími většinou entomopatogenními houbami^{55,64–68}. V současnosti je známo okolo 30 destruxinů. Předpokládá se, že tato skupina metabolitů je pravděpodobně syntetizována extraribosomovým multienzymatickým systémem⁶⁹, a právě tento aspekt je zřejmě příčinou velké rozmanitosti těchto metabolitů^{55,70}.

Biologická aktivita roseotoxinů a destruxinů byla a je i dnes předmětem výzkumu. Byla u nich zjištěna nezanedbatelná insekticidní^{55,64–66,71,72}, nematocidní⁷³, imunomodulační⁷⁴ nebo fytotoxická aktivita^{67,68} a neméně zajímavá toxicita testovaná na modelech teplokrevných živočichů⁷⁵. Lze zmínit i nedávno objevený kardiostimulační účinek roseotoxinu B a destruxinů A, B (cit.⁶¹).

Biologická aktivita cyklopepsipeptidů tedy rovněž potvrzuje, že i zde jsou nalézány zajímavé a využitelné vlastnosti, a tudíž nelze na tyto látky pohlížet jen jako na mykotoxiny. Hranice mezi užitečností a toxicitou může být však značně úzká, jako je tomu i u jiných biologicky aktivních látek.

5. Závěr

Po mnoha letech od popisu prvního trichothecenu z houby *T. roseum* si dnes připomínáme tuto skupinu látek v nových souvislostech. Sekundární produkty hub mohou působit akutní i chronické otravy a stejně tak se mohou stát významnými léčivy. Přísloví s mincí o dvou stranách nás bezpochyby nutí ke snaze hlouběji a důkladněji těmto přírodním látkám porozumět.

Tato práce byla podpořena Grantovou agenturou České republiky (grant č. GA ČR 203/02/1417) a MSM JO6/98: 122200002.

LITERATURA

- Cole R. J., Cox R. H.: *Handbook of Toxic Fungal Metabolites*, str. 152. Academic Press, New York 1981.
- Fang Y.: *Chemical Agents Development in USSR*, překlad z čínštiny, Alexandria Va.: Defense Technical Information Center 1983.
- Heyndrickx A. (ed.): *First World Congress: New Compounds in Biological and Chemical Warfare: Toxicological Evaluation, Proceedings*. State University of Ghent and the National Science Foundation of Belgium, Ghent 1984.
- Marshall E.: *Science* 275, 745 (1997).
- Zilinskas R. A.: *J. Am. Med. Assoc.* 278, 418 (1997).
- Wannemacher R. W., Jr., Wiener S. L.: *Trichothecene Mycotoxins, Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare* (Sidell F. R., Takafuji E. T., Franz D. R., ed.), část I: *Warfare, Weapons, and the Casualty, Textbook of Military Medicine: Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare* (Zajtchuk R., Bellamy R. F., ed.). Office of the Surgeon General, Walter Reed Army Medical Center, Washington, D.C. 1997.
- Wannemacher R. W., Bunner D. L., Neufeld N. P., v knize: *Mycotoxins and Animal Foods* (Smith J. E., ed.). CRC Press, Boca Raton 1991.
- Velíšek J.: *Chemie potravin* 3, 205 (1999).
- Krska R., Baumgartner S., Josephs R.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 371, 285 (2001).
- Bennett J. W.: *Mycopathologia* 100, 3 (1987).
- Samson R. A.: *J. Med. Mycol.* 30, 9 (1992).
- Tobin R. S., Baranowski E., Gilman A. P., Kuiper-Goodman T., Miller J. D., Giddings M.: *Can. J. Public Health* 78, 1 (1987).
- Bilai V. I.: *Fuzarii*, str. 360. Naukova Dumka, Kiev 1977.
- Chasseur C., Suetens C., Michel V., Mathieu F., Begaux F., Nolard N., Haubruge E.: *Int. J. Orthopaedy* 25, 154 (2001).
- Whetzel H. H.: *Int. Nat. Sci. Bull.* 5, 3 (1909).
- Boning K.: *Phytopathology* 6, 113 (1933).
- Koch L. W.: *Sci. Agric.* 15, 80 (1934).
- Greaney F. J., Machacek J. E.: *Sci. Agric.* 15, 377 (1935).
- Seifert K. A., Seize G. L., Savard M. E.: *Mycologia* 89, 250 (1997).
- Freeman G. G., Morrison R. I.: *Nature* 162, 30 (1948).
- Betina V.: *Mycotoxins: Chemical, Biological and Environmental Aspects*. Elsevier, Amsterdam 1993.
- Grove J. F.: *Nat. Prod. Rep.* 5, 187 (1988).
- Grove J. F.: *Nat. Prod. Rep.* 10, 429 (1993).
- Vyhlaška Ministerstva zdravotnictví ČR č. 298/1997 Sb.
- Miller J. D., Trenholm H. L.: *Mycotoxins in Grain*. Eagan Press, St. Paul 1994.
- Reiss J.: *Lebensweise, Nutzen, Schaden, Bekämpfung*. Springer, Berlin 1986.
- Franck B.: *Angew. Chem.* 96, 462 (1984).
- Kidd M. T., Hagler W. M., Qureshi M. A.: *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 17, 385 (1995).
- Richard J. L., Pier A. C., Tiffany L. H.: *Mycopathol. Mycol. Appl.* 40, 160 (1970).
- Wright V. F., Vesonder R. F., Ciegler A., v knize: *Microbial and Viral Pesticides* (Kursak E., ed.), str. 559. Marcel Dekker, New York 1982.
- Brian P. W., Dawkins A. W., Grove J. F., Hemmig H. G., Lowe D., Norris G. L. F.: *J. Exp. Bot.* 12, 1 (1961).
- IPCS Environmental Health Criteria, Selected Mycotoxins, str. 105. WHO, Vammala 1990.
- Watson S. A., Mirocha C. J., Hayes A. W.: *Fundam. Appl. Toxicol.* 4, 700 (1984).
- Bunner D. L., Neufeld H. A., Brennecke L. H., Campbell Y. G., Dinterman R. E., Pelosi J. G.: *Clinical and Hematologic Effects of T-2 Toxin in Rats*. U.S. Army Medical Research Institute of Infectious Diseases (DTIC ADA158874) 1985.
- Wannemacher R. W., Bunner D. L., Neufeld N. P., v knize: *Toxicity of Trichothecene and Other Related Toxins in Rabbits and Animals*, *Mycotoxins and Animal Foods* (Smith J. E., ed.). CRC Press, Boca Raton 1991.
- Gilman J. C.: *A Manual of Soil Fungi*. State College Press, Ames 1957.
- Hong C. X., Michailides T. J.: *Plant Dis.* 81, 112 (1997).
- Sipiahioglu H. N., Heperkan D.: *Food Microbiology* 17, 401 (2000).
- Betina V., Vaňková M.: *Biologia* 32, 943 (1977).
- Ayer W. A., Miao S.: *Can. J. Chem.* 71, 487 (1993).
- Godteredsen W. O., Vandegál S.: *Acta Chem. Scand.* 19, 1088 (1965).
- Corley D. G., Millerwideman M., Durley R. C.: *J. Nat. Prod.* 57, 422 (1994).
- Madhyastha M. S., Marquardt R. R., Masi A., Borsa J., Frohlich A. A.: *J. Food Prot.* 57, 48 (1994).
- Bawden F. C., Freeman G. G.: *J. Gen. Microbiol.* 7, 154 (1952).
- Iida A., Konishi K., Kubo H., Tomioka K., Tokuda H., Nishino H.: *Tetrahedron Lett.* 37, 9219, (1996).
- Okazaki K., Yoshizawa T., Kimura S.: *Agric. Biol. Chem.* 53, 1441 (1989).

47. Okazaki K., Yoshizawa T., Kimura S.: Biosci., Biotechnol., Biochem. 56, 523 (1992).
48. Isaka M., Punya J., Lertwerawat Y., Tanticharoen M., Thebtaranonth Y.: J. Nat. Prod. 62, 329 (1999).
49. Scot P. M., Lawrence J. W., van Walbeek W.: Appl. Microbiol. 20, 839 (1970).
50. Filtenborg O., Frisvad J. C.: Lebensm. Wiss. Technol. 13, 128 (1980).
51. Vicam: Firemní katalog „Mycotoxin Test Kits“ 2001.
52. Springer J. P., Cole R. J., Dorner J. W., Cox R. H., Richard J. L., Barnes C. L., van der Helm D.: J. Am. Chem. Soc. 106, 2388 (1984).
53. Engstrom G. W.: J. Agric. Food Chem. 26, 1403 (1978).
54. Shemyakin M. M.: Angew. Chem. 72, 342 (1960).
55. Gupta S., Roberts D. W., Renwick J. A. A.: J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1 1989, 2347.
56. Tamura S., Takahashi N., v knize: *Naturally Occurring Insecticides* (Jacobson M., Crosby O. G., ed.), str. 499. Marcel Dekker, New York 1971.
57. Yeh S. F., Pan W., Ong G. T., Chiou A. J., Chuang C. C., Chiou S. H., Wu S. H.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 229, 65 (1996).
58. Morel E., Pais M., Turpin M., Guyot M.: Biochem. Pharmacother. 37, 184 (1983).
59. Engstrom G. W., DeLance J. V., Richard J. L. Baetz A. L.: J. Agric. Food Chem. 23, 244 (1975).
60. Flesh P., Stockinger G.: Weinwissenschaft 42, 111 (1987).
61. Tsuno A., Kamijo M., Takemoto N., Sato Y., Ajisaka K.: J. Antibiot. 50, 1007 (1997).
62. Jegorov A., Havlíček V., Sedmera P.: J. Mass Spectrom. 33, 274 (1998).
63. Suzuki A., Kuama S., Kodaira Y., Tamura S.: Agric. Biol. Chem. 30, 517 (1966).
64. Kodaira Y.: Agric. Biol. Chem. 25, 261 (1961).
65. Suzuki A., Taguchi H., Tamura S.: Agric. Biol. Chem. 34, 813 (1970).
66. Pais M., Das B. C., Ferron P.: Phytochemistry 10, 715 (1981).
67. Ayer W. A., Pena-Rodrigues L. M.: J. Nat. Prod. 50, 400 (1987).
68. Buchwaldt L., Jensen J. S.: Phytochemistry 20, 2311 (1991).
69. Peeters H., Matha V., Roberts D. W.: *Proc. Int. Conf. Biopesticides, Theory and Practice* (Jegorov A., Matha V., ed.), str. 169. ČSVTS, České Budějovice 1990.
70. Traber R., Hofman H., Loosli H. R., Ponelle M., Wartburg A.: Helv. Chim. Acta 70, 13 (1987).
71. Dowd P. F., Cole R. J., Vesonder R. F.: J. Antibiot. 41, 1868 (1988).
72. Jegorov A., Matha V., Hradec H.: Comp. Biochem. Physiol. C 35, 97 (1992).
73. Kawazu K., Murakami T., Ono Y., Kanzaki H., Kobayashi A., Mikawa T., Yoshikawa N.: Biosci., Biotechnol., Biochem. 57, 98 (1993).
74. Huxham I. M., Lackie A. M., McCorkindale A. J.: J. Insect Physiol. 35, 97 (1989).
75. Richard J. L., Tiffany L. H., Pier A. C.: Mycopathol. Mycol. Appl. 38, 313 (1969).

M. Žabka^a and A. Jegorov^b (^a*Faculty of Agriculture, University of South Bohemia, České Budějovice*, ^b*IVAX CR Co., Research Unit, České Budějovice*): **Comeback of the Fungus That Gave Name to Trichothecenes**

The investigation of mycotoxins is the topic of current concern in food production at present, when the food quality is often replaced by only quantitative criteria of production. Special attention attracts the potential use of mycotoxins in terrorist attacks. In contrast, some of the compounds can find interesting pharmaceutical use. The paper is dedicated to the 55th anniversary of discovery of trichothecenes, which were first found in the *Trichothecium roseum* fungus appearing as a natural contaminant in some agricultural commodities.

DEOXYFLUORGLUKOSA, MEZNÍK VE VÝVOJI POZITRONOVÉ EMISNÍ TOMOGRAFIE (HISTORIE JEDNOHO VÝZKUMU)

JOSEF PACÁK^a a MILOSLAV ČERNÝ^b

^aKatedra učitelství a didaktiky chemie a ^bKatedra organické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Albertov 3, 128 42 Praha 2
e-mail: pacak@natur.cuni.cz, mila@natur.cuni.cz

Došlo dne 3.1.2002

Klíčová slova: deoxyfluorglukosa, FDG, ¹⁸FDG, pozitronová emisní tomografie (PET)

Deoxyfluorglukosa a její osud jsou ukázkou křivolakosti cest vědeckého bádání i důkazem, že základní výzkum může překvapivě přinášet cenné podněty i plody tam, kde se to původně vůbec nepředpokládalo, ba ani předpokládat nemohlo.

Historie 2-deoxy-2-fluor-D-glukosy, zkráceně označované jako deoxyfluorglukosa (v medicíně se používá zkratka FDG), sahá do padesátých let minulého století, kdy na místo vedoucího katedry organické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy nastoupil tehdejší prezident Československé akademie věd, profesor František Šorm. Ten na katedře ustavil tři pracovní týmy, z nichž jeden dostal za úkol studovat syntézy různě substituovaných monosacharidů. Jeho vedoucím byl Jaroslav Staněk a členy oba autoři tohoto příspěvku; později, koncem šedesátých let, k nim přibyli ještě Tomáš Trnka a Jitka Doležalová.

Při jednom ze zasedání katedry upozornil akademik Šorm na velký význam některých fluorovaných derivátů přírodních sloučenin v medicíně a navrhl naší pracovní skupině, aby zvažila téma zavádění fluorových atomů do molekul cukrů. Tento podnět nás zaujal a od té doby se stal jedním z hlavních pracovních témat naší skupiny.

Na počátku našeho výzkumu byly známy jen tři deoxyfluorderiváty sacharidů, a to 6-deoxy-6-fluor-D-glukosa (cit.¹), 6-deoxy-6-fluor-D-galaktosa (cit.²) a 5-deoxy-5-fluor-D-ribosa (cit.³), jejichž strukturní vzorce představuje schéma 1.

Naším cílem ale bylo připravit takový deoxyfluormonosacharid, který by měl atom fluoru situován, na rozdíl od výše uvedených derivátů, na místě hydroxyskupiny sekundární. Rozhodli jsme se pokusit se o přípravu 2-deoxy-2-fluor-D-glukosy, od níž jsme si slibovali výraznou biologickou účinnost s ohledem na její strukturní podobnost s D-glukosou. Jevilo se totiž jako pravděpodobné, že fluorový atom, vázaný

k atomu uhlíku, se svým objemem, elektronegativitou i schopností vytvářet vodíkové vazby natolik podobá hydroxyskupině, že by se takto pozměněná molekula glukosy měla chovat téměř jako glukosa, a tu v živých systémech simulovat.

Záměna hydroxyskupiny glukosy fluorovým atomem na uhlíkovém atomu C-2 musí rušivě působit na průběh glykolýzy deoxyfluorglukosy, při níž může dojít nanejvýš k její fosforylaci v poloze C-6 účinkem enzymu hexokinasy za tvorby deoxyfluorglukosa-6-fosfátu. Z toho pramenil náš další předpoklad, že tento cukerný derivát by v důsledku své výrazné strukturní podobnosti s přírodní glukosou měl sice do buněk vstupovat, ale neměl by jim být zdrojem energie. A protože právě nádorové buňky mají, vzhledem ke svému rychlému růstu, velkou spotřebu glukosy, dalo se očekávat, že by deoxyfluorglukosa mohla jevit kancerostatický účinek tím, že by tyto buňky zahlcovala, aniž by je vyživovala. Tak by měla brzdit, nebo dokonce zastavovat jejich růst.

Tato myšlenka autory článku inspirovala k tomu, že se rozhodli tuto sloučeninu syntetizovat, což se po zdolání nemalých úskalí podařilo v druhé polovině roku 1968. Vycházeli jsme přitom z 1,6-anhydro-β-D-glukopyranosy, získané pyrolýzou škrobu. Sedmistupňovou syntézou (schéma 2), jejímž klíčovým krokem bylo stereoselektivní štěpení epoxidového kruhu již dříve popsáné 1,6:2,3-dianhydro-4-O-benzyl-β-D-mannopyranosy³ hydrogenfluoridem draselným ve vroucím ethan-1,2-diolu, jsme ji získali ve formě bezbarvých, sladce chutnajících krystalů, jejichž strukturu jsme potvrdili pomocí ¹H NMR.

Předběžnou zprávu o této vůbec první syntéze 2-deoxy-2-fluor-D-glukosy jsme uveřejnili⁴ v roce 1969, podrobnější později⁵ v roce 1972.

Často se stává, že se ve světě vědy pracuje na témž problému současně na několika místech. A tak ze zcela stejných důvodů jako my, tedy pro předpokládané kancerostatické účinky, se pokoušela o syntézu téže látky i velká skupina pracovníků v londýnském Chester Beatty Research Institute (Institute of Cancer Research, Royal Cancer Hospital), vedená prof. A. B. Fosterem. Prováděli ji jinak než my, dokončili ji o několik měsíců později⁶, a k její identifikaci si vyžádali náš vzorek. Světového primátu v její přípravě, o němž prokazatelně a z pochopitelných důvodů velmi usilovali, tedy ke svému velkému zklamání nedosáhli.

Zkoušky na kancerostatickou účinnost deoxyfluorglukosy, provedené v Londýně, bohužel ukázaly, že nádorové buňky touto sloučeninou ničeny nejsou. Přesto naše představa o přednostním pronikání deoxyfluorglukosy do nádorových buněk, závislých na rychlém přísunu glukosy, a o jejím hromadění

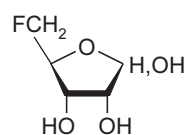
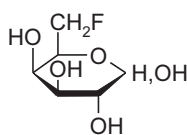
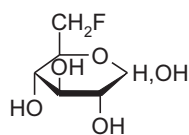


Schéma 1

6-deoxy-6-fluor-D-glukosa

6-deoxy-6-fluor-D-galaktosa

5-deoxy-5-fluor-D-ribosa

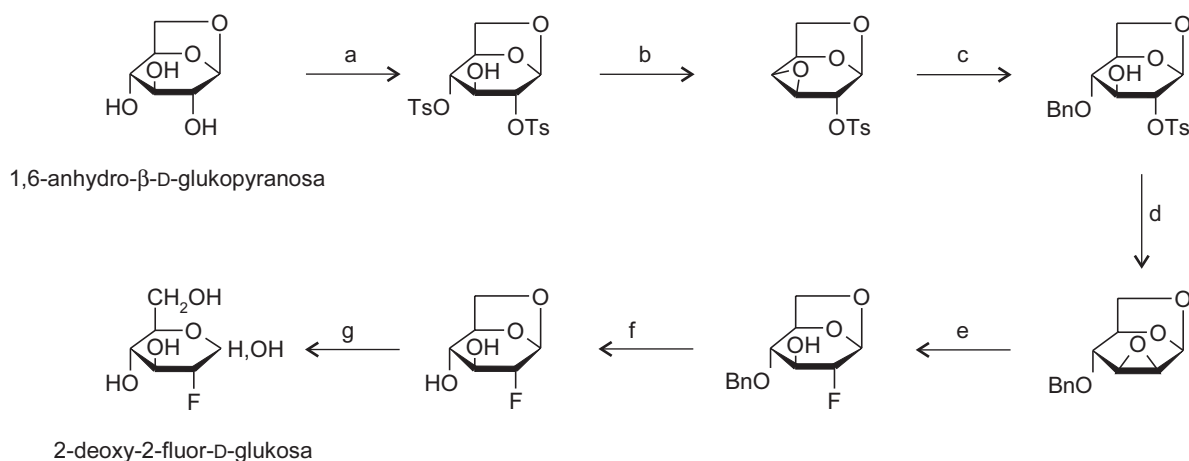


Schéma 2. Ts – tosyl, Bn – benzyl; a – TsCl/py, b – MeO^- , c – BzOH/*p*-TsOH, d – MeO^- , e – $\text{KHF}_2/\text{ED}/200\text{ }^\circ\text{C}$, f – $\text{H}_2/\text{Pd/C}$, g – 1% *p*-TsOH/ $\text{H}_2\text{O}/165\text{ }^\circ\text{C}$

v nich byla potvrzena jako správná o necelých deset let později, kdy se stala chemickým základem metabolického zkoumání mozku a jedné z nejdokonalějších diagnostických metod nádorových onemocnění.

Došlo k tomu v polovině sedmdesátých let v USA, kdy skupina vědců v Brookhavenu (National Laboratories, Associate Universities, Upton, NY, U.S.A.) vyvinula⁷ pozitronovou emisní tomografii, zkráceně označovanou jako PET. Její princip, velmi zjednodušeně řečeno, spočívá v tom, že registruje přítomnost atomů izotopu, emitujícího pozitrony. Ty se při styku s elektrony ve svém těsném sousedství anihilují a výsledkem této anihilace je vznik γ -záření. Analýzou směru a intenzity jeho paprsků je možno za pomoci velmi složitých detekčních zařízení zjistit rozložení i koncentraci takového izotopu. Jeho atomy musejí být ovšem zabudovány do sloučeniny s vhodnými vlastnostmi. Takovou sloučeninu právě tvůrci PET hledali a narazili přitom na naši práci o deoxyfluor-glukose, která výrazně ovlivnila další vývoj této diagnostické metody. V roce 1976 nás překvapivě navštívil Dr. Drell (Behring Diagnostics, La Jolla, CA, U.S.A.) s žádostí o prodej 10 g deoxyfluor-glukosy, aniž by nám vysvětlil důvod svého zájmu o ni. Tím, že jsme jeho žádosti vyhověli, se deoxyfluor-glukosa stala dostupnou i výše zmíněné skupině badatelů, kteří si na ní mohli ověřit, že tato sloučenina má potřebné vlastnosti pro pozitronovou emisní tomografii, tedy že snadno proniká do buněk, hromadí se v nich, ale na rozdíl od glukosy se neštěpí (nepodléhá glykolýze), a neposkytuje jim tedy energii, a konečně, že je možné zavést do ní pozitrony emitující atom radioizotopu ^{18}F s vhodným poločasem rozpadu (110 minut). To je vedlo k rozhodnutí syntetizovat deoxyfluor-glukosu nesoucí právě tento radioizotop. Syntézu takového sloučeniny, totiž 2-deoxy-2- ^{18}F fluor-D-glukosy, uskutečnil v roce 1978 Ido se svými spolupracovníky⁸. Je třeba říci, že při syntéze postupovali jinak než my: pro poměrně krátký poločas rozpadu vnášeli radioaktivní fluor do molekuly cukru až v její závěrečné fázi. V současnosti se výroba 2-deoxy-2- ^{18}F fluor-D-glukosy provádí i u nás, a to na dvou pracovištích, v Ústavu jaderné fyziky AV ČR v Řeži a v Ústavu jaderného výzkumu Řež a.s. Pracovní postup spočívá v nukleofilní substituci 1,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-2-*O*-trifluormethylsulfonfyl- β -D-mannosy působením iontů $^{18}\text{F}^-$ a následné hydrolýze⁹.

Vzhledem k mimořádné strukturní podobnosti glukosy a deoxyfluor-glukosy bylo prokázáno, že tam, kam vstupuje glukosa, činí tak i deoxyfluor-glukosa, jen s tím rozdílem, že se nemetabolizuje, a tedy se v buňkách pouze hromadí. Sledováním její koncentrace, zobrazené barevnými snímky fiktivních, vhodně zvolených řezů zkoumanými tkáněmi nebo orgány, lze tedy zpětně usuzovat na intenzitu spotřeby glukosy. Použitím značené deoxyfluor-glukosy v pozitronové emisní tomografii vznikla metoda, označovaná jako FDG-PET, využívající sledování distribuce glukosy v různých orgánech, jíž se převážně používá k odhalování nádorového bujení, zejména v jeho nejranějších stádiích, kdy jinými metodami není ještě zjištělné, a ke sledování úspěšnosti jeho léčení. Slouží také k mapování fyziologických i patologických dějů probíhajících v mozku (mozek je za normálních okolností vyživován výlučně glukosou, a proto ji intenzivně metabolizuje) a je např. cenným pomocníkem neurochirurgů při lokalizování chorobných ložisek v mozku (nádory, epilepsie). Uplatňuje se i při diagnóze Alzheimerovy choroby. Významná je rovněž pro hodnocení metabolických poměrů při infarktu myokardu.

S aplikací této metody na psy začali Gallagher a spol.¹⁰, do humánní medicíny ji uvedli Phelps a spol.¹¹, k prvním studiím různých mozkových funkcí posloužila Reivichovi a spol.¹² a Phelpsovi a spol.¹³, do onkologie ji zavedli Som a spol.¹⁴

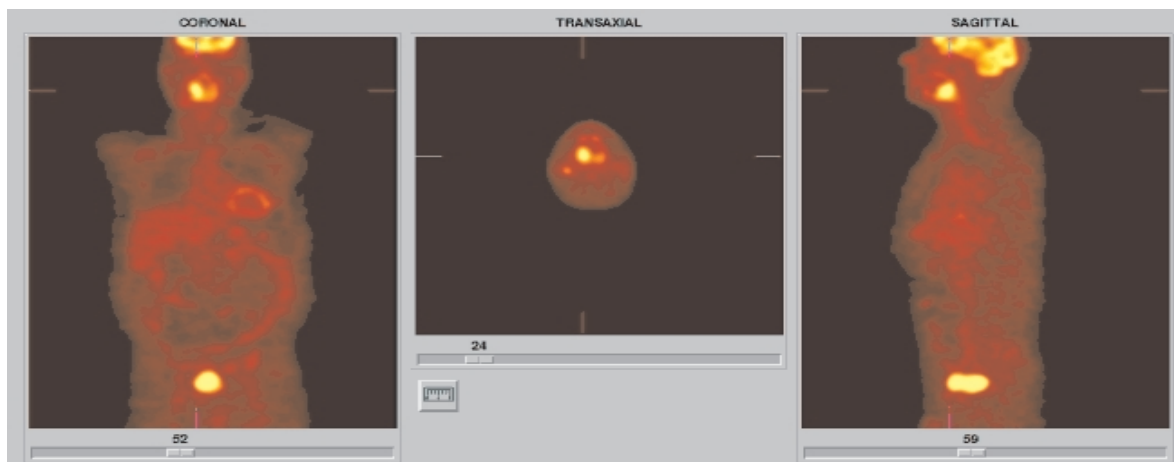
Badatelé, kteří se o vznik a využití pozitronové emisní tomografie v lékařství zasloužili zejména, američtí profesori Kuhl z univerzity v Michiganu a Phelps¹⁵ z kalifornské univerzity v Los Angeles, byli v roce 2001 oceněni za svůj objev jednou z nejprestižnějších cen světové medicíny, cenou Charlese F. Ketteringa. Naši syntézu deoxyfluor-glukosy zhodnotil prof. Kuhl takto: „Your 1969 paper was an extremely important contribution that has impacted both neuroscience and cancer diagnosis“.

Metoda FDG-PET se využívá v Praze v PET-Centru v Nemocnici Na Homolce, dobudovaném v roce 1999 a vedeném MUDr. O. Bělohávkem. Slouží jak k diagnostice, tak i k výzkumu onkologických onemocnění¹⁶. Počet vyšetřených pacientů přesáhl v roce 2001 již tři tisíce. Je třeba konstatovat, že zatímco ve vyspělých zemích připadá na milion obyvatel jedno PET-centrum, u nás je to zatím desetkrát méně. V Ja-

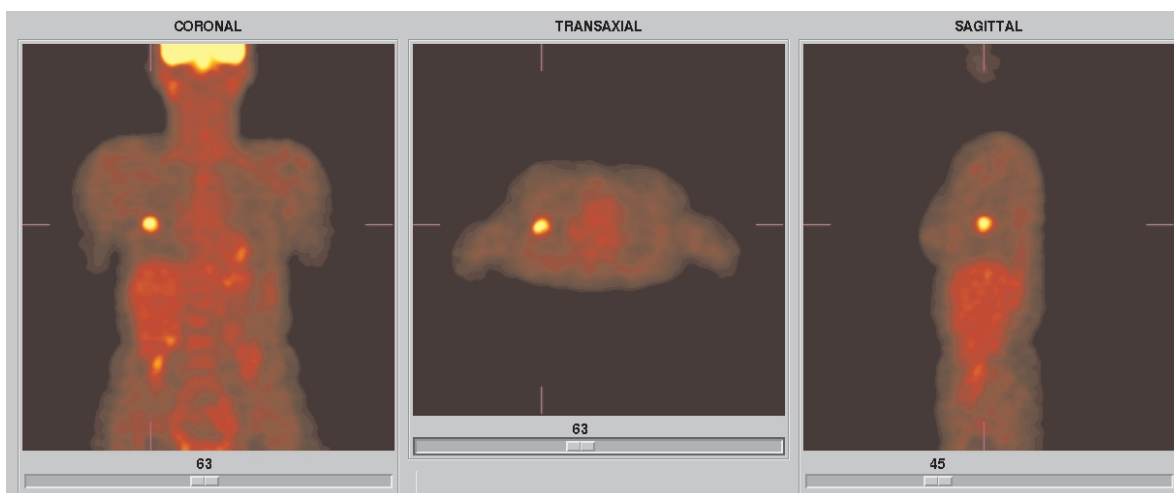
ponsku se metody FDG-PET užívá k preventivním prohlídkám obyvatel.

Závěrem můžeme konstatovat, že naše původní představa

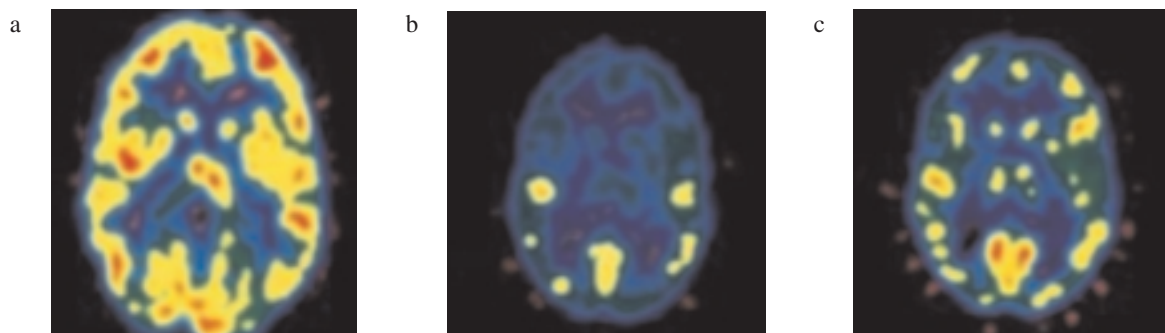
deoxyfluoroglukosy jako sloučeniny dokonale simulující glukosu a stejně jako ona rychle vstupující do buněk náročných na přísun glukosy, se ukázala jako správná, a výrazně ovlivnila



Obr. 1. Zobrazení zhoubného nádoru hltnu. Tři navzájem kolmé tomografické řezy, získané metodou FDG-PET. Vysoká koncentrace FDG v mozku je v souladu s intenzivní fyziologickou spotřebou glukosy, zobrazení močového měchýře odpovídá vylučování FDG močí. Maximální koncentrace FDG je vyjádřena žlutou barvou. Jiné zobrazovací metody nádor vůbec neodhalily.



Obr. 2. Zobrazení zhoubného nádoru v pravé plicí. Podrobnější popis obrázku je obdobou popisu uvedeného u obr. 1



Obr. 3. Změny intenzity metabolismu glukosy; tomografický řez mozku před aplikací kokainu (a), po 10 dnech (b) a po 100 dnech (c) po užití drogy. Intenzita metabolismu glukosy vyjádřená koncentrací FDG po podání drogy prudce klesá a ani po 100 dnech se plně neobnovuje. Nejintenzivnější metabolické pochody vyjadřuje červená, resp. žlutá barva

začátek vývoje převratné lékařské diagnostické metody FDG-PET tím, že se uplatnila jako její chemický princip.

Nelze vyloučit, že i neznáčená, námi připravená deoxyfluorglukosa, s ohledem na svou strukturní podobnost s glukosou a současně metabolickou odlišností a možností její detekce pomocí ^{19}F NMR (cit. ^{17,18}), sehraje v budoucnu významnou úlohu také v jiných biochemických či lékařských disciplínách.

Obrázky 1–3 ukazují příklady praktické aplikace metody FDG-PET.

Za poskytnutí prvních dvou snímků autoři děkují MUDr. O. Bělohávkovi z PET-Centra, Nemocnice Na Homolce, za třetí snímek prof. J. S. Fowlerové z Brookhaven National Laboratories, New York, U.S.A.

LITERATURA

1. Helferich B., Gnüchtel A.: Ber. Dtsch. Chem. Ges. 74, 1035 (1941).
2. Taylor N. F., Kent P. W.: J. Chem. Soc. 1958, 872.
3. Trnka T., Černý M.: Collect. Czech. Chem. Commun. 36, 2216 (1971).
4. Pacák J., Točík Z., Černý M.: Chem. Commun. 1969, 77.
5. Pacák J., Podešva J., Točík Z., Černý M.: Collect. Czech. Chem. Commun. 37, 2589 (1972).
6. Adamson J., Foster A. B.: Chem. Commun. 1969, 309.
7. Phelps M. E., Hoffman E. J., Mullani N. A., Ter-Pogossian M. M.: J. Nucl. Med. 16, 210 (1975).
8. Ido T., Wan C. N., Casella V. R., Fowler J. S., Wolf A. P., Reivich M., Kuhl D. E.: J. Labelled Compd. Radiopharm. 14, 175 (1978).
9. Toorongan S. A., Mulholland G. K., Jewett D. M., Bachelor M. A., Kilbourn M. R.: Nucl. Med. Biol. 17, 273 (1990).
10. Gallagher B. M., Ansari A., Atkins H., Casella V., Christman D. R., Fowler J. S., Ido T., MacGregor R., Som P., Wan C. N., Wolf A. P., Kuhl D. E., Reivich M.: J. Nucl. Med. 19, 1154 (1978).
11. Phelps M. E., Hoffman E. J., Selin C., Huang S. C., Kuhl D. E.: J. Nucl. Med. 19, 1311 (1978).
12. Reivich M., Kuhl D. E., Wolf A. P.: Circ. Res. 44, 127 (1979).
13. Phelps M., Huang S.-C., Hoffman E., Selin C., Kuhl D.: Ann. Neurol. 6, 371 (1979).
14. Som P., Atkins H. L., Bandyopadhyay D.: J. Nucl. Med. 21, 670 (1980).
15. Phelps M. E.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97, 9226 (2000).
16. Bělohávek O., Tábořská K., Šimonová K., Janeba D.: Prakt. Lekar 80, 503 (2000).
17. Nakada T., Kwee I., Griffey B. V., Griffey R. H.: Magn. Reson. Imaging 6, 633 (1988).
18. Wiebe L. I.: J. Nucl. Med. 42, 1679 (2001).

J. Pacák^a and M. Černý^b (^a*Department of Teaching Chemistry and* ^b*Department of Organic Chemistry, Faculty of Sciences, Charles University, Prague*): **Deoxyfluoroglucose, a Milestone in the Development of Positron Emission Tomography (History of a Research)**

The history and individual steps of the first successful synthesis of 2-deoxy-2-fluoro-D-glucose are described. In many respects, this substance perfectly imitates the behavior of naturally occurring glucose: e.g., the rate of incorporation into the cells rapidly consuming glucose (such as the cerebral, cardiac or tumorous ones) is almost the same in both cases. Nevertheless, due to the presence of a fluoro atom at C-2, the fluorinated derivative does not undergo glycolysis and, therefore, accumulates (in the form of its 6-phosphate) in the cells. Thanks to these properties of the substance, eight years after the synthesis, its ^{18}F -labeled derivative has been successfully used in positron emission tomography (PET), as applied to the exploration of physiological and pathophysiological functions of the brain and, above all, in clinical oncology. Thus, early stages of tumor growth can be detected and malignity of the tumor can be revealed even in those cases, which are not detectable by other imaging methods.

METABOLISMUS BILIRUBINU A ZPŮSOBY ELIMINACE JEHO TOXICITY

LIBOR VÍTEK^a, LUCIE SEDLÁČKOVÁ^b,
PAVEL BRANNÝ^c a TOMÁŠ RUML^{b,*}

^aÚstav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky a IV. Interní klinika, 1. Lékařská fakulta Univerzity Karlovy, U nemocnice 2, 128 08 Praha 2, ^bÚstav biochemie a mikrobiologie a Centrum integrované genomiky, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^cMikrobiologický ústav, Akademie věd České republiky, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4

e-mail: vitek@cesnet.cz, luciesedlackova@hotmail.com, branny@biomed.cas.cz, tomas.ruml@vscht.cz

Došlo dne 25.IV.2002

Klíčová slova: bilirubin, novorozenecká žloutenka, hyperbilirubinémie, Crigler-Najjarův syndrom, enterohepatální cirkulace bilirubinu, enterosystémová cirkulace bilirubinu, střevní mikroflóra, kolonizace

Obsah

1. Úvod
2. Fyzikálně-chemické vlastnosti bilirubinu
3. Metabolismus bilirubinu
4. Nekonjugované hyperbilirubinémie
5. Závěr

1. Úvod

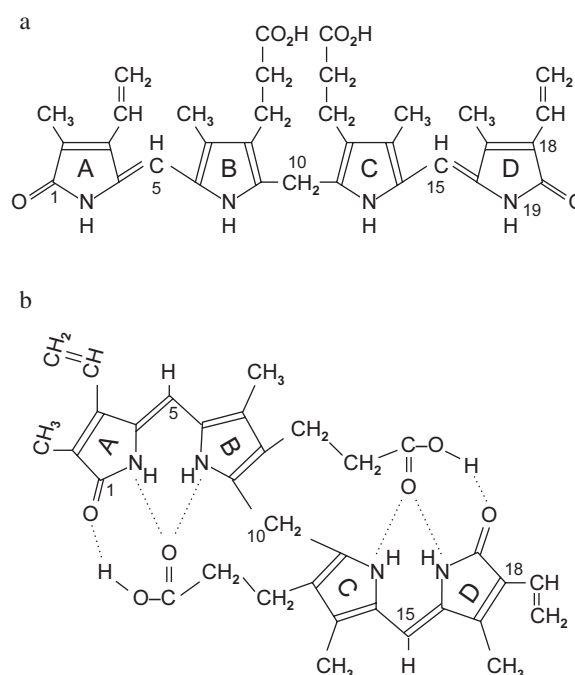
Bilirubin je hlavní organický produkt katabolismu hemu v systémové cirkulaci a jeho produkce, metabolismus i vylučování jsou udržovány v rovnováze. Při narušení této rovnováhy dochází k akumulaci bilirubinu v séru a hovoříme o tzv. hyperbilirubinémii. Ačkoli mírná elevace hladin bilirubinu v séru má v důsledku jeho silných antioxidačních vlastností pro organismus protektivní charakter¹, dochází při překročení určité hladiny bilirubinu v séru k nebezpečí rozvoje toxických účinků zejména v oblasti centrálního nervového systému². Tímto nebezpečím jsou ohroženi především jedinci s novorozeneckou hyperbilirubinémií a dále pak pacienti s těžkými vrozenými nekonjugovanými hyperbilirubinemiemi. Aby bylo možno dokonale pochopit patogenezi těchto onemocnění, je nutné připomenout některá základní fakta týkající se fyzikálně-chemických vlastností bilirubinu a jeho metabolismu.

2. Fyzikálně-chemické vlastnosti bilirubinu

Nekonjugovaný bilirubin je lineární tetrapyrrolový pigment nepolárního charakteru. Přirozeně se vyskytující biliru-

bin je označován jako bilirubin IX α (4Z,15Z) (obr. 1a), což vyjadřuje, že vzniká z isomeru IX protoporphyrinu, který se nachází v hemu a hemoproteinech, a to štěpením α -methinového můstku porfyrinového makrocyclu s dvojnými vazbami v poloze 4 a 15 v konfiguraci Z (obr. 1b) (cit.³). Tato struktura a konfigurace umožňuje vznik vodíkových vazeb mezi postranním řetězcem tvořeným kyselinou propionovou na kruhu B a polárními skupinami na kruhu D a mezi postranním řetězcem tvořeným kyselinou propionovou na kruhu C a polárními skupinami na kruhu A (obr. 1b). Tyto intramolekulární vodíkové vazby způsobují významné konformační změny, které blokují expozici polárních skupin molekuly vodným rozpouštědlem a zároveň tvoří rigidní strukturu molekuly; tato konformace a konfigurace je tudíž základem hydrofobního chování bilirubinu³.

Vzhledem k tetrapyrrolové struktuře se nekonjugovaný bilirubin může vyskytovat v několika isomerech. Převládajícím isomerem v plazmě je bilirubin IX α . Ostatní známé isomery bilirubinu, bilirubin IX β , IX γ , IX δ , se nacházejí ve žluči pouze ve stopových množstvích. Vznikají otevřením porfyrinového kruhu v jiné poloze než v oblasti α -methinového můstku. Tyto isomery nevytvářejí intramolekulární vodíkové můstky, jsou tedy ve vodě rozpustnější a nevyžadují konjugaci pro vyloučení žlučí³.



Obr. 1. **Struktura a konformace bilirubinu:** a) konvenční „lineární tetrapyrrolová“ struktura přirozeně se vyskytujícího isomeru bilirubinu IX α , b) planární reprezentace trojrozměrné konformace molekuly bilirubinu IX α se zobrazenými vodíkovými můstky

* Autor pro korespondenci

3. Metabolismus bilirubinu

Denní tvorba bilirubinu dosahuje u dospělých lidí přibližně 4 mg na kilogram tělesné váhy a není vázána na určitý orgán⁴. Buňky retikuloendoteliálního systému kostní dřeně, sleziny a jater jsou obzvláště uzpůsobeny pro degradaci hemu, avšak také jiné buňky disponují enzymy, jejichž působením vzniká bilirubin. Za normálních podmínek je přibližně 80 % celkového bilirubinu produkováno odbouráváním hemu, prostatické skupiny hemoglobinu, který je uvolňován do cirkulace degradací stárnoucích červených krvinek⁴. Zbylých 20 % produkce bilirubinu pochází z konverze bílkovin obsahujících hem jako např. myoglobin, cytochromy a některé enzymy (například katalasa či peroxidasa)⁴.

Hem je červenohnědý cyklický tetrapyrrolový porfyrin s centrálně navázaným atomem železa. K jeho degradaci na biliverdin IX α , tmavě zelený pigment, dochází pomocí mikrosomálního enzymu hemoxygenasy (obr. 2). Tento enzym katalyzuje oxidativní štěpení α -methinového můstku za produkce oxidu uhelnatého⁵, který difunduje z buněk a je transportován krví do plic, jimiž je vyloučen. Poté dochází k redukci centrální methinové skupiny biliverdinu IX α biliverdin reduktasou za vzniku bilirubinu IX α (obr. 2) (cit.⁵).

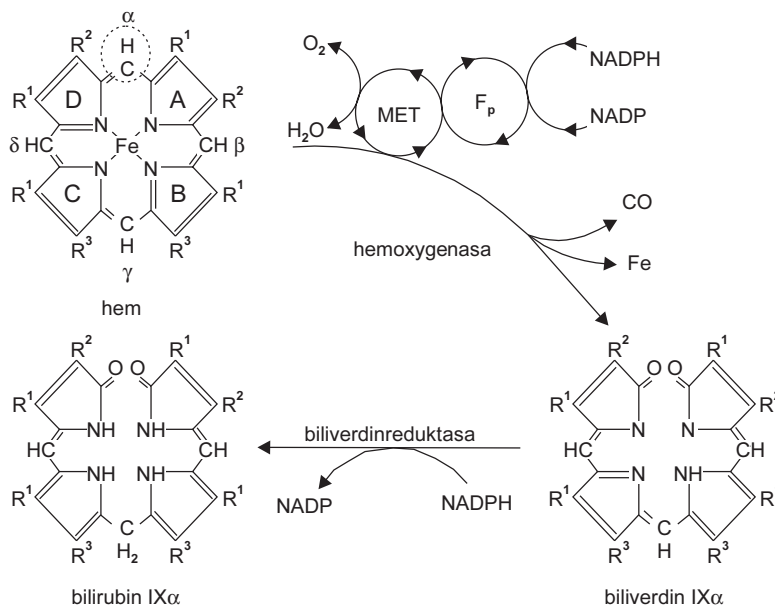
U nižších živočichů, jako jsou obojživelníci, plazi a ptáci, nedochází ke tvorbě bilirubinu, ale vylučován je biliverdin, ve vodě rozpustný netoxický prekurzor bilirubinu⁶. Důvodem je zřejmě vývoj placenty, neboť polární biliverdin nepřestupuje placentární bariéru, zatímco nekonjugovaný bilirubin ano, čímž se zabráňuje akumulaci degradačních produktů hemu v těle plodu⁷. Další příčinou produkce bilirubinu jsou pravděpodobně jeho antioxidační vlastnosti. Jak již bylo uvedeno, bilirubin účinkuje jako velmi silný endogenní antioxidant, silnější než biliverdin, a hraje významnou protektivní roli v patogenezi celé řady onemocnění¹. Koncentrace oxidu uhelnatého v krvi, vznikajícího reakcí hemoxygenasy, je nepatrná,

a tudíž nepůsobí toxicky⁶. I při takto nízkých hladinách však hraje důležitou roli při buněčné signalizaci v centrálním nervovém systému⁸ a v modulaci cévního tonu⁹. Stanovení produkce oxidu uhelnatého lze také využít v diagnostice novorozeneckých hemolytických anémií¹⁰.

Po degradaci hemu v retikuloendoteliálním systému se bilirubin dostává do systémové cirkulace a je transportován do jater. V plazmě se váže zejména na albumin jako hlavní transportní bílkovinu¹¹. Vazba bilirubinu na albumin je biologicky důležitá, protože solubilizuje nepolární nekonjugovaný bilirubin, a umožňuje tak jeho transport ve vodním prostředí. Za nepřítomnosti albuminu je rozpustnost bilirubinu menší než 1 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Stejně jako ostatní sloučeniny pevně vázané na plazmatický albumin není nekonjugovaný bilirubin filtrován ledvinami a hlavní cestou jeho vylučování je sekrece játry do žluči¹².

Játra jsou přizpůsobena pro transport bilirubinu ze systémové cirkulace do žluči, a tento transport probíhá disociací vazby s albuminem a translokací přes cytoplazmatickou membránu hepatocytu. Předpokládá se, že na sinusoidálním pólu existuje několik aktivních transportních systémů pro bilirubin. Tyto transportéry patří do velké skupiny transportérů pro organické anionty, jejichž funkce a význam jsou v současnosti předmětem intenzivního výzkumu¹².

V jaterní buňce je nekonjugovaný bilirubin solubilizován vazbou na specifické intracelulární proteiny (ligandiny)¹². Jde o cytosolové proteiny označované jako proteiny Y a Z. Protein Y je cytosolový protein patřící do proteinové rodiny glutathion-*S*-transferasy. Tyto bílkoviny s molekulovou hmotností zhruba 45 kDa představují asi 2 % zásoby cytosolových proteinů člověka¹². Protein Z je nízkomolekulární cytosolový protein o molekulové hmotnosti 12 kDa, jehož funkcí je také intracelulární vazba bilirubinu v hepatocytu¹². Byl identifikován jako jaterní isoforma cytoplazmatického proteinu vázícího mastné kyseliny (FABP_c) a patří do rozsáhlé rodiny příbuz-



Obr. 2. Katabolická přeměna hemu na bilirubin-IX α , MET = mikrosomální elektronový transportní systém; R¹ = -CH₃, R² = -CH=CH₂, R³ = -CH₂-CH₂-COOH, F_p = flavoprotein

ných bílkovin, které hrají důležitou roli například v metabolismu retinoidů a volných mastných kyselin¹².

Díky intramolekulárním vodíkovým vazbám spojujícím polární skupiny molekuly bilirubinu je přirozený isomer nekonjugovaného bilirubinu IX α -4Z,15Z minimálně rozpustný ve vodě a nemůže být transportován žlučí; proto musí být převeden na polárnější formu, čehož je dosaženo konjugací s UDP-glukuronovou kyselinou (UDP = uridindifosfát). Tato reakce je katalyzována enzymem bilirubin UDP-glukuronosyltransferasou a při ní dochází k esterifikaci karboxylových skupin postranních karboxyethylových řetězců v pozici C-8 a C-12 a uvolnění intramolekulárních vodíkových můstků¹². Bilirubindiglukuronid představuje u lidí hlavní konjugát bilirubinu ve žluči (přibližně 80 %), v menší míře se vyskytuje ve formě monoglukuronidu. V lidské žluči se vyskytují také stopová množství ostatních konjugátů bilirubinu, jako jsou monoglukosidy, monoglukosid-monoglukuronidy a xylosidy¹². Bilirubindiglukuronid je vylučován z hepatocytů do žluči aktivním transportním systémem, který byl nedávno identifikován jako multispecifický transportér organických iontů (cMOAT/MRP2). Kromě bilirubindiglukuronidů usnadňuje také transport bromsulfonfaleinu, glutathionu či jeho konjugátů, konjugovaných leukotrienů a konjugovaných hydrofobních žlučových kyselin¹². Konjugovaný bilirubin vyloučený do žluči se žlučovými cestami dostává do tenkého střeva a odtud do střeva tlustého. Zde je dekonjugován bakteriálním enzymem β -glukuronidasou za odštěpení zbytku kyseliny glukuronové a poté degradován bakteriálními reduktasami na hydroderiváty bilirubinu souborně nazývané urobilinoidy¹³.

Nekonjugovaný bilirubin i urobilinoidy se za určitých okolností zpětně resorbují tlustým střevem a portální krví se dostávají zpět do jater, kde jsou částečně znovu vyloučeny do žluči a částečně se dostávají do systémové cirkulace^{14,15}. Hovoříme o enterohepatální, respektive enterosystémové cirkulaci.

Existence enterohepatální cirkulace nekonjugovaného bilirubinu byla definitivně prokázána až pomocí radioaktivně značeného bilirubinu. Bylo zjištěno, že resorbován může být pouze nekonjugovaný bilirubin, zatímco konjugovaný bilirubin musí být předem hydrolyzován, neboť bilirubindiglukuronid nemůže být pro svou velikost a polaritu ze střeva resorbován. K absorpci může docházet v tenkém i v tlustém střevě¹⁵.

Enterohepatální a enterosystémová cirkulace bilirubinu je však za fyziologických podmínek jen minimální a nemá příliš velký vliv na hladinu bilirubinu v séru. Střevní resorpce bilirubinu však významně stoupá při splnění některé z následujících podmínek:

- 1) absence střevní mikroflóry redukující bilirubin,
- 2) malabsorpce žlučových kyselin, které v zažívacím traktu solubilizují nekonjugovaný bilirubin,
- 3) přerůstání střevní mikroflóry v proximálních částech zažívacího traktu, kde dochází ke zvýšené dekonjugaci bilirubindiglukuronidu bakteriální β -glukuronidasou s následnou vyšší resorpcí nekonjugovaného bilirubinu do portálního řečiště.

Bakterie, které osidlují intestinální trakt, představují velmi složitý, ale relativně stabilní ekosystém. V proximální polovině tenkého střeva se bakterie prakticky nevyskytují (0–10³ mikroorganismů na 1 ml střevního obsahu) z důvodu kyselého prostředí udržovaného žaludeční šťávou. Distální polovina

tenkého střeva představuje přechodovou zónu, počet bakterií zde postupně roste a složení mikroflóry (hlavně G⁻ a anaerobní bakterie) se podobá složení v tlustém střevě. Tlusté střevo je nejhustěji osídlenou částí intestinálního traktu. Obsahuje přibližně 10¹⁰ mikroorganismů na 1 ml střevního obsahu a více než 400 různých bakteriálních druhů. Počet anaerobních bakterií převažuje nad aeroby. Mezi hlavní druhy patří zejména *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium* a v menším počtu *Clostridium*, *Lactobacillus* a *Streptococcus*¹⁶. Stabilita a složení mikroflóry jsou ovlivněny metabolickou aktivitou vyskytujících se mikroorganismů. Vzájemně ovlivňují svůj růst, a tím mezi sebou udržují rovnováhu, a zároveň tak chrání svého hostitele před infekcemi gastrointestinálními patogeny.

Jak bylo uvedeno výše, podléhá nekonjugovaný bilirubin v lumen zažívacího traktu redukcí střevní mikroflórou na hydroderiváty souborně nazývané urobilinoidy. Metabolismus bilirubinu na urobilinoidy představuje pro bilirubin přirozenou katabolickou cestu, která je skutečně podmíněna střevními bakteriemi. Tento fakt byl potvrzen trvalou absencí urobilinoidů ve stolici potkanů bez střevní mikroflóry¹⁷ a také vymizením urobilinoidů ve stolici krys a lidí po podání perorálních antibiotik¹⁸. Intestinální mikroflóra redukující bilirubin je přítomná v gastrointestinálním traktu dospělého člověka ve velkém množství. Produkce urobilinoidů v zažívacím traktu dospělého člověka dosahuje za normálních podmínek 50–250 mg za den. Navzdory takové enormní produkci urobilinoidů metabolická cesta mikrobiální konverze bilirubinu zůstává stále neobjasněna. Ačkoliv mikrobiální hydrogenace bilirubinu byla připsána rodu *Clostridium* už ve dvacátých letech minulého století¹⁹, první bakterie s bilirubin redukující katalytickou aktivitou byla izolována²⁰ až v roce 1960. Šlo o kmen *Clostridium ramosum* izolovaný ze stolice potkanů kmene Gunn. Druhá bakterie s podobnými katalytickými vlastnostmi patřící do rodu *Bacteroides fragilis* byla izolována v roce 1972 (cit.²¹). V nedávné době byly izolovány ze stolice novorozenců dvě nové bakterie redukující bilirubin patřící do rodu *Clostridium* *perfringens* a *C. difficile*²².

4. Nekonjugované hyperbilirubinémie

Nekonjugované hyperbilirubinémie dělíme na hyperbilirubinémie vrozené a získané. Mezi vrozené nekonjugované hyperbilirubinémie řadíme defekty glukuronidace bilirubinu v játrech. Podle stupně postižení rozlišujeme mírnou formu nazývanou benigní hyperbilirubinémie (Gilbertův syndrom) a dále mnohem vzácnější, avšak také mnohem závažnější Crigler-Najjarův syndrom I. a II. typu. Medicínsky nejvýznamnější problém představuje novorozenecká žloutenka, což je získaná forma nekonjugované hyperbilirubinémie. Prevalence novorozenecké hyperbilirubinémie přesahující 205 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ (což je hodnota určující tzv. patologickou novorozeneckou žloutenku) se pohybuje u zdravých donošených novorozenců v rozmezí 8–20 % (cit.^{23,24}). Takto závažná hyperbilirubinémie může vést k poškození centrálního nervového systému s extrapyramidovými poruchami, ke ztrátě sluchu, nebo k poruchám motorického či psychosomatického vývoje².

V patogenезi novorozenecké žloutenky se uplatňují tři základní mechanismy:

- 1) Prvním faktorem je nadprodukce bilirubinu. Jeho denní tvorba dosahuje u zdravých novorozenců v průměru 8–

10 mg bilirubinu na kilogram tělesné váhy, což je více než dvojnásobek normální produkce dospělých. Je to dáno zejména obměnou fetálního hemoglobinu za hemoglobin adultní v raném novorozeneckém období²³.

- 2) Dalším faktorem je defekt transportu bilirubinu v hepatocytech způsobený insuficiencí aktivních transportérů bilirubinu, jejichž exprese se zvyšuje až po několika týdnech po narození²⁵ a dále pak defekt glukuronidace bilirubinu způsobený nedostatečnou aktivitou bilirubin-UDP-glukuronosyltransferasy (0,1% hodnoty u dospělých v prvních deseti dnech života); ta se zvyšuje teprve v šestém až čtrnáctém týdnu života²⁶.
- 3) Třetím faktorem je absence střevní mikroflóry v novorozeneckém věku. Na rozdíl od dospělých jedinců novorozenci resorbují značné množství nekonjugovaného bilirubinu tenkým střevem, což je způsobeno absencí intestinální mikroflóry²², která za normálních okolností snižuje množství nekonjugovaného bilirubinu ve střevním lumen pro zpětnou resorpci do portálního řečiště. Bylo zjištěno, že mikrobiální konverze bilirubinu hraje v neonatálním období důležitou roli v jeho homeostáze a že absence bakteriální redukce je významným faktorem v patogenezi novorozenecké žloutenky²². Kolonizace zažívacího traktu bakteriemi redukujícími bilirubin je dosaženo na dostatečné úrovni umožňující produkci urobilinoidů srovnatelnou s hodnotami dospělých až v šestém týdnu po narození²². Při narození je v tenkém střevě nejenom málo bakterií redukujících bilirubin (tudíž minimální produkce urobilinoidů), ale je zde také značná aktivita enzymu β -glukuronidasy pocházejícího z mateřského mléka²⁷. Ta způsobuje, že nekonjugovaný bilirubin vzniká ve větší míře a může být snáze resorbován²².

Základním léčebným opatřením v terapii patologické novorozenecké žloutenky je fototerapie, u těžkých forem one-mocnění výměnné transfúze²⁸. Při použití fototerapie je pacient vystaven světelnému záření o vysoké intenzitě a rozmezí vlnových délek 420–470 nm. To vede ke zvýšené oxidaci a isomeraci bilirubinu za vzniku polárních derivátů bilirubinu, které mohou být relativně snadno vyloučeny játry bez další metabolizace²⁹. Tato léčebná modalita je běžně používána, a přestože je obecně považována za plně bezpečnou a účinnou, existuje při jejím použití potenciální nebezpečí poškození novorozenců i zdravotnického personálu elektromagnetickým zářením²⁴. Další možnou komplikací fototerapie, i když nepříliš častou, je rozvoj tzv. „bronze-baby“ syndromu způsobeného nahromaděním rozpadových produktů bilirubinu během fototerapie³⁰. Použití výměnné transfúze je vyhrazeno pouze pro novorozence s hladinami bilirubinu přesahujícími u zdravých, donošených novorozenců 340 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ a je zatíženo všemi příslušnými riziky vyplývajícími z invazivního přístupu a převodu krevních derivátů²⁸. Existuje také možnost použití metaloporfyrinů za účelem inhibice tvorby bilirubinu vedoucí ke snížení jeho hladiny v séru³¹. Ačkoli byla prokázána účinnost této metody, není běžně používána, hlavně kvůli vysokému výskytu nežádoucích účinků.

Existuje mnoho důkazů ukazujících důležitost enterohepatální a enterosystémové cirkulace bilirubinu v patogenezi novorozenecké žloutenky. Tyto důkazy se opírají zejména o výsledky studií prováděných na laboratorních zvířatech i u člověka za účelem inhibice enterohepatální a enterosystémové cirkulace bilirubinu využívajících podávání střev-

ních sekvestrantů bilirubinu. Bylo prokázáno, že tato inhibice vede k výraznému snížení hladin bilirubinu v séru u jedinců s novorozeneckou hyperbilirubinemií. Šlo o studie s perorálním podáváním agarů³², aktivního uhlí³³ nebo cholestyraminu³⁴. Účinnost tohoto přístupu se podařilo prokázat také u pacientů s Gilbertovým syndromem při perorálním podávání síranu zinečnatého³⁵ a u pacientů s Crigler-Najjarovým syndromem při perorálním podávání fosforečnanu vápenatého³⁶ a cholestyraminu³⁷ jako střevních sekvestrantů bilirubinu. Podobně bylo prokázáno ve studii na Gunnových potkaních (hyperbilirubinemický kmen s vrozeným defektem bilirubin UDP-glukuronosyltransferasy) snížení sérových hladin bilirubinu po perorálním podání enzymu bilirubinoxidasy v imobilizované formě³⁸. Použití střevních sekvestrantů bilirubinu je však zatíženo značným množstvím nežádoucích účinků. Přesto má využití inhibice enterohepatální cirkulace bilirubinu v terapii nekonjugovaných hyperbilirubinemií své opodstatnění. Jako alternativa se jeví využití potence bakteriální redukce bilirubinu ve střevním lumen, což je postup vycházející z fyziologie střevního metabolismu bilirubinu, který by neměl být provázen nežádoucími účinky umělých sorbentů. Tento způsob by mohl mít velké využití zejména u pacientů s novorozeneckou hyperbilirubinemií, neboť v perinatálním období je střevní redukce bilirubinu prakticky nulová.

5. Závěr

Problematika těžkých nekonjugovaných hyperbilirubinemií představuje zejména s ohledem na výskyt novorozenecké žloutenky závažný zdravotnický problém s významnými ekonomickými dopady³⁹. I když je léčba fototerapií obecně uznávaným standardem, lze očekávat, že zavedením nových a účinných metod založených na inhibici enterohepatální a enterosystémové cirkulace bilirubinu dojde ke snížení výskytu novorozenecké žloutenky i k významnému zlevnění celého léčebného postupu.

Tato práce byla podpořena grantem GA ČR č. 310/021436 a grantem CEZ:J19/18:223300006 MŠMT.

LITERATURA

1. Vítek L., Jirsa M., Jr., Brodanová M., Kaláb M., Mareček Z., Danzig V., Novotný L., Kotal P.: *Atherosclerosis* (Berlin) 160, 449 (2002).
2. Walker P. C.: *Clin. Pharmacokinet.* 13, 26 (1987).
3. Falk H., v knize: *Bile Pigments and Jaundice. Molecular, Metabolic and Medical Aspects* (Ostrow J. D., ed.), kap. 2. Marcel Dekker, New York 1986.
4. Bissell D. M., v knize: *Bile Pigments and Jaundice. Molecular, Metabolic and Medical Aspects* (Ostrow J. D., ed.), kap. 5. Marcel Dekker, New York 1986.
5. Rodgers P. A., Stevenson D. K.: *Clin. Perinatol.* 17, 275 (1990).
6. Marilena G.: *Biochem. Mol. Med.* 61, 136 (1997).
7. Pascolo L., Ferneti C., Garcia-Mediavilla M. V., Ostrow J. D., Tiribelli C.: *FEBS Lett.* 495, 94 (2001).

8. Leffler C. W., Nasjletti A., Yu C., Johnson R. A., Fedinec A. L., Walker N.: *Am. J. Physiol.* 276, 1641 (1999).
9. Pannen B. H., Bauer M.: *Life Sci.* 62, 2025 (1998).
10. Smith D. W., Hopper A. O., Shahin S. M., Cohen R. S., Ostrander C. R., Ariagno R. L., Stevenson D. K.: *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 3, 77 (1984).
11. Berk P. D., Noyer C.: *Semin. Liver. Dis.* 14, 325 (1994).
12. Berk P. D., Noyer C.: *Semin. Liver. Dis.* 14, 331 (1994).
13. Moscovitz A., Weimer M., Lightner A., Petryka Z. J., Davis E., Watson C. J.: *Biochem. Med.* 4, 149 (1970).
14. Brink M. A., Méndez-Sánchez N., Carey M. C.: *Gastroenterology* 110, 1945 (1996).
15. Billing B. H., v knize: *Bile Pigments and Jaundice. Molecular, Metabolic and Medical Aspects* (Ostrow J. D., ed.), kap. 10. Marcel Dekker, New York 1986.
16. Van Eldere J.: *Dizertační práce*. Leuven University Press, Leuven 1988.
17. Saxerholt H., Midtvedt T., Gustafsson B. E.: *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 44, 573 (1984).
18. Carlstedt-Duke B., Gustafsson B. E., Midtvedt T.: *Scand. J. Gastroenterol.* 20, 92 (1985).
19. Passini F., Czakes J.: *Wien Klin. Wochenschr.* 36, 657 (1923).
20. Gustafsson B. E., Lanke L. S.: *J. Exp. Med.* 112, 975 (1960).
21. Fahmy K., Gray C. H., Nicholson D. C.: *Biochim. Biophys. Acta* 264, (1972).
22. Vitek L., Kotal P., Jirsa M., Malina J., Černá M., Chmelař D., Fevery J.: *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 30, 294 (2000).
23. Maisels M. J.: *Semin. Liver. Dis.* 8, 148 (1988).
24. Gies H. P., Roy C. R.: *Health Phys.* 58, 313 (1990).
25. Levi A. J., Gatmaitan Z., Arias I. M.: *Lancet* 2, 139 (1969).
26. Kawade N., Onishi S.: *Biochem. J.* 196, 257 (1981).
27. Gourley G. R., Arend R. A.: *Lancet* 1, 644 (1986).
28. Kalpoyannis N., Androulakis N., Hadjigerorgiou E., Papadatos J., Oeconomidou O., Nicolopoulos D.: *Clin. Pediatr.* 21, 602 (1982).
29. McDonagh A. F., Lightner D. A.: *Pediatrics* 75, 443 (1985).
30. Radermacher E. H., Noifalise A., Hornchen H., Maier R. D., Bigalke K. H.: *Klin. Pediatr.* 189, 379 (1977).
31. Martinez J. C., Garcia H. O., Otheguy L. E., Drummond G. S., Kappas A.: *Pediatrics* 103, 1 (1999).
32. Caglayan S., Candemir H., Aksit S., Kansoy S., Asik S., Yaprak I.: *Pediatrics* 92, 86 (1993).
33. Ulstrom R. A., Eisenklam E.: *J. Pediatr. (Berlin)* 65, 27 (1964).
34. Nicolopoulos D., Hadjigeorgiou E., Malamitsi A., Kalpoyannis N., Karli I., Papadakis D.: *J. Pediatr. (Berlin)* 93, 684 (1978).
35. Méndez-Sánchez N., Roldán-Valadez E., Flores-Sánchez M. A., Carey M. C., Uribe M.: *Gastroenterology* 112, 1332 (1997).
36. Van der Veere C. N., Jansen P. L., Sinaasappel M., Van der Meer R., Van der Sijs H., Rammeloo J. A., Goyens P., Van Nieuwkerk C. M., Oude Elferink R. P.: *Gastroenterology* 112, 455 (1997).
37. Arrowsmith W. A., Payne R. B., Littlewood J. M.: *Arch. Dis. Child.* 50, 197 (1975).
38. Soltys P. J., Mullon C., Langer R.: *Artif. Organs* 16, 331 (1992).
39. Newman T. B., Easterling J., Stevenson D. K.: *Am. J. Dis. Child.* 144, 364 (1990).

L. Vitek^a, L. Sedláčková^b, P. Branny^c, and T. Ruml^b
 (^a*Institute of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics and 4th Department of Internal Medicine, 1st Faculty of Medicine, Charles University, Prague,* ^b*Institute of Biochemistry and Microbiology and Centre of Integrated Genomics, Institute of Chemical Technology, Prague,* ^c*Microbiological Institute, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*): **Metabolism of Bilirubin and Methods of Elimination of Its Toxicity**

Bilirubin is the principal intravascular catabolic product of heme metabolism. In disorders of its degradation, bilirubin accumulates in serum, which leads to hyperbilirubinemia. If it exceeds a certain critical limit, a serious damage of central nervous system may result. There are two clinical situations when these complications may result: the rare Crigler-Najjar syndrome of type I, which is a disease caused by congenital deficiency of a liver enzyme conjugating bilirubin with glucuronic acid, thus enabling its elimination by liver, and, in particular, very frequent neonatal hyperbilirubinemia. This disease has a multifactorial etiology; in its pathogenesis participate primarily (1) overproduction of bilirubin in exchange of fetal for adult hemoglobin, (2) immature liver transport and conjugation systems for bilirubin and, last but not least, (3) absence of intestinal microflora reducing bilirubin in intestinal lumen. The absence of the microbial activity leads to accumulation of bilirubin in intestine and its subsequent resorption in portal and further in systemic circulation (enterohepatal and enterosystemic circulation of bilirubin), which manifests itself by elevation of bilirubin levels in serum. The basic therapeutic measure in treatment of neonatal hyperbilirubinemia and also of the Crigler-Najjar syndrome of type I is phototherapy. Its principle is photoisomerization and photodegradation of bilirubin to polar fragments, which can be excreted from the organism more easily. An alternative is the exsanguination transfusion. Due to the significance of intestinal metabolism of bilirubin, the possibility of affecting the enterohepatal and enterosystemic circulation of bilirubin seems very promising in the treatment of these hyperbilirubinemic conditions.

PŘÍRODNÍ LÁTKY V PREVENCI ONEMOCNĚNÍ TRÁVICÍHO TRAKTU

MARTIN MODRIANSKÝ^a,
KATEŘINA VALENTOVÁ^a, VĚRA PŘIKRYLOVÁ^b
a DANIELA WALTEROVÁ^a

^aÚstav lékařské chemie a biochemie, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc, ^bLaborator biotransformací, Mikrobiologický ústav, Akademie věd České republiky, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4
e-mail: oregon@tunw.upol.cz

Došlo 8.4.03, přepracováno 6.5.03, přijato 12.5.03.

Klíčová slova: funkční potravina, potravní doplněk, fytochemikálie, prebiotikum, probiotikum, biologická aktivita, trávicí trakt

Obsah

1. Úvod
2. Fytochemikálie v trávicím traktu savců
3. Polyfenolové látky
4. Fytosteroly
5. Oligo- a polysacharidy s β -glykosidovou vazbou
6. Závěr

1. Úvod

Složení potravy hraje důležitou úlohu v předcházení vzniku nádorových, kardiovaskulárních a chronických metabolických onemocnění. Vhodným složením denní stravy, zvýšeným podílem ovoce, zeleniny, luštěnin a obilovin, lze výrazně pozitivně ovlivňovat metabolické procesy v trávicím traktu (GIT) člověka¹. Funkční změny sliznic a složení střevní bakteriální flóry, vyvolané dlouhodobě nevhodným složením diety, mohou být prvotními příčinami zánětlivých a nádorových onemocnění žaludku, duodena, střev a průjemových onemocnění nebakteriálního původu². Potraviny a jejich složky, které mají pozitivní fyziologické účinky na lidský organismus, se v odborné literatuře označují jako nutraceutika a dělí se na funkční potraviny a potravní doplňky³. Legislativa ČR a EU rozlišuje potraviny pro zvláštní účely a potravní doplňky^{4,5}. Funkční potravina (FP), např. některé druhy ovoce a zeleniny, je produkt s nutriční hodnotou, který je bezpečný a má příznivý účinek na jednu nebo více fyziologických funkcí. Potravními doplňky (PD) jsou *i*) látky se známou nutriční funkcí jako např. vitaminy, minerální látky, aminokyseliny a esenciální polynenasycené mastné kyseliny, *ii*) látky s prokázaným pozitivním fyziologickým účinkem jako např. rostlinné polyfenolové látky, glukosamin, karnitin, koenzym Q₁₀, melatonin, ornithin s α -ketoglutarovou kyselinou, pyruvát, taurin, živočišné proteoglykany a *iii*) léčivé rostliny v intaktní formě, jejich celkové nebo frakcionované extrakty, které jsou chemicky charakteri-

zované a standardizované na určitou skupinu látek, jako např. komplex flavonolignanů ze semen *Sylibum marianum* nazývaný silymarin či extrakt z pšeničných klíčků standardizovaný na obsah substituovaných benzochinonů. FP a PD mají vliv na celkový zdravotní stav a mohou významně podporovat fyzický výkon či snižovat riziko vzniku některých nemocí. Za prokazatelný fyziologický účinek je u FP/PD zpravidla odpovědná určitá skupina látek – fytochemikálií. Jsou to fenolové kyseliny, lignany, flavonoidy, anthokyany, proanthokyanidiny, fytosteroly, karotenoidy, polynenasycené mastné kyseliny, glukosinoláty, oligo- a polysacharidy s β -glykosidovou vazbou a další komponenty.

V tomto článku je podán přehled současných poznatků o účincích tří biologicky aktivních skupin přírodních látek na funkci trávicího traktu u savců. Jedná se o *i*) polyfenolové látky – lignany, flavonoidy a flavonolignany, *ii*) fytosteroly a *iii*) nehydrolyzovatelné β -poly- a oligosacharidy.

2. Fytochemikálie v trávicím traktu savců

K prvnímu kontaktu člověka s fytochemikálií obsaženou v dietě dochází v trávicím traktu, kde se uplatňuje její pleiotropní účinek, zejména chemoprotektivní. Četné práce dokumentují snížený výskyt zánětlivých a nádorových onemocnění GIT u populací konzumujících rostlinnou stravu bohatou na polynenasycené mastné kyseliny, polyfenolové látky (především flavonoidy), fytosteroly a nestravitelnou vlákninu^{6,7}. Za farmakologicky věrohodně prokázanou lze považovat např. účinnost přípravků obsahujících oleje bohaté na ω -3 polynenasycené kyseliny u ulcerativní kolitidy (chronický zánět sliznice tlustého střeva), která byla potvrzena v několika klinických studiích⁸. Pro nutraceutika, jejichž fyziologický účinek je lokalizován na tlusté střevo, je užíván název prebiotika⁹. Jsou tak označovány nestravitelné součásti potravy, které příznivě ovlivňují selektivní stimulaci růstu/aktivity jednoho nebo omezeného počtu bakteriálních kmenů v tlustém střevě. Patří k nim fytochemikálie, označované jako vláknina potravy, kam jsou řazeny celulóza, kondenzované tanniny (polymery tvořené molekulami katechinu), ligniny (polymery tvořené molekulami *p*-kumaryl-, koniferyl- a sinapylalkoholu) a polysacharidy necelulosového charakteru, např. hemice-lulosity, pektiny a fruktany. Tyto substance nejsou hydrolyzovány a tráveny v žaludku, duodenu a tenkém střevě hostitele, ale k jejich fermentaci dochází v tlustém střevě působením bakteriální mikroflóry. Bakterie působí v intestinálním traktu hostitele několika mechanismy: metabolizují vlákninu na krátké (C2 až C4) mastné kyseliny, podporují sekreci trávicích enzymů, modulují metabolismus lipidů, stimulují peristaltiku a aktivují imunitní systém hostitele, tvoří bariéru proti patogenním mikroorganismům, antigenům a toxickým sloučeninám z lumen střeva, ovlivňují proliferaci a diferenciaci epitelálních buněk, absorpci látek v hladkém střevě, entero-hepatální oběh žlučových kyselin, podílí se na imunitní ochraně organismu, jsou nezbytné pro aktivaci mukózní imunity a imunokompetentních buněk a fermentaci nestravitelných

složek potravy^{10,11}. Prebiotika selektivně stimulují růst lidského organismu prospěšných druhů bakterií, především *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*. Pokud některé druhy těchto kmenů jsou složkami funkčních potravin, pak jsou označovány jako probiotika.

3. Polyfenolové látky

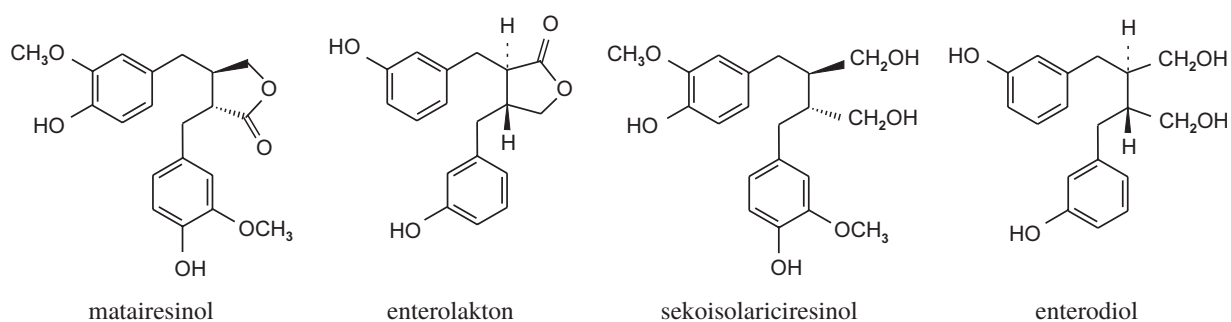
Polyfenolové látky (PFL), kam náleží C6–C1 a C6–C3 fenolové kyseliny, stilbeny, lignany, flavonoidy (flavony/flavonoly, dihydroflavony/dihydroflavonoly, katechiny/flavanoly, anthokyany, isoflavony a chalkony), flavonolignany, ligniny a proanthokyanidiny (kondenzované tanniny), jsou nejrozsáhlejší skupinou sekundárních metabolitů rostlin¹². V denní dietě (Evropa a USA) je příjem PFL, vyjádřený jako množství flavonoidglykosidů, cca 1 g na den (cit.¹³). PFL mají široké spektrum fyziologicky příznivých účinků, zejména jsou známy jako antioxidanty¹⁴. Jsou aktivními složkami funkčních potravin (např. cibule, citrusové plody, hrozny, zelený čaj), potravních doplňků (např. extrakt z listů *Ginkgo biloba*) a některých volně prodáváných léků (např. Flavobion®). V dalším textu bude věnována pozornost jen těm skupinám PFL, u kterých byl prokázán jejich fyziologický

účinek již v GIT. Jsou to lignany, některé flavonoidy a flavonolignany.

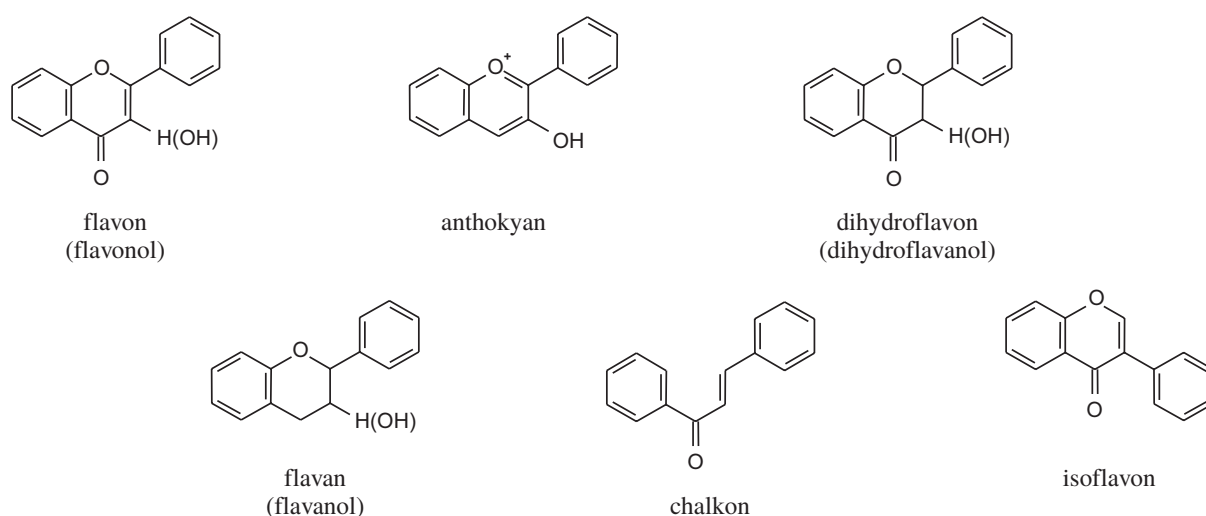
V ý s k y t a s t r u k t u r a

Nejbohatším zdrojem lignanů jsou semena lnu setého (*Linum usitatissimum*). Jejich prekurzory jsou fenylalanin a C6–C3 fenolové kyseliny. Molekula lignanu je tvořena dvěma fenylpropanovými jednotkami spojenými přes centrální uhlíky (C-8 a C-8') postranních propanových řetězců. Existuje několik skupin, lišících se spojením těchto jednotek a oxidačním stupněm. Jednotlivé deriváty se liší počtem a polohou hydroxyskupin, které mohou být methylovány, acylovány nebo glykosylovány (obr. 1).

Flavonoidy jsou rozšířeny ve všech rostlinách, kde mají důležité postavení v metabolismu a fyziologických funkcích. Izolovány jsou jako glykosidy/aglykony. Jejich prekurzory jsou chalkony, které vznikají kondenzací *p*-kumaroyl-CoA a tří molekul malonyl-CoA. Základní skelet flavonoidů je tvořen dvěma benzenovými jádry spojenými heterocyklickým kruhem – pyranem/pyronem (obr. 2). 2-Fenylchroman (flavan) může být modifikován oxidací (přítomnost další dvojné vazby), redukcí karbonylu, ionizací heterocyklického kyslíku nebo isomerizací na 3-fenylchroman. Poslední skupinou PFL



Obr. 1. Lignany a jejich „živočišné“ metabolity



Obr. 2. Základní strukturní typy flavonoidů

jsou flavonolignany (obr. 3). Jejich základní skelet je fenylchromanon (flavonoidní komponenta) spojený s molekulou koniferylalkoholu (lignanová komponenta).

Metody stanovení

V rostlinném materiálu se PFL stanovují jako celkové fenoly reakcí s Folin-Ciocalteuovým činidlem¹⁵. Další metody zahrnují HPLC na reverzní fázi s UV-VIS detekcí při 280 nm (cit.¹⁶), MS (cit.¹⁷), coulometrickou¹⁸ či amperometrickou detekcí¹⁹. Dále se pro stanovení s úspěchem využívá kapilární elektroforéza^{20,21} a TLC (cit.²²). Souborně o stanovení PFL pojednává cit.²³

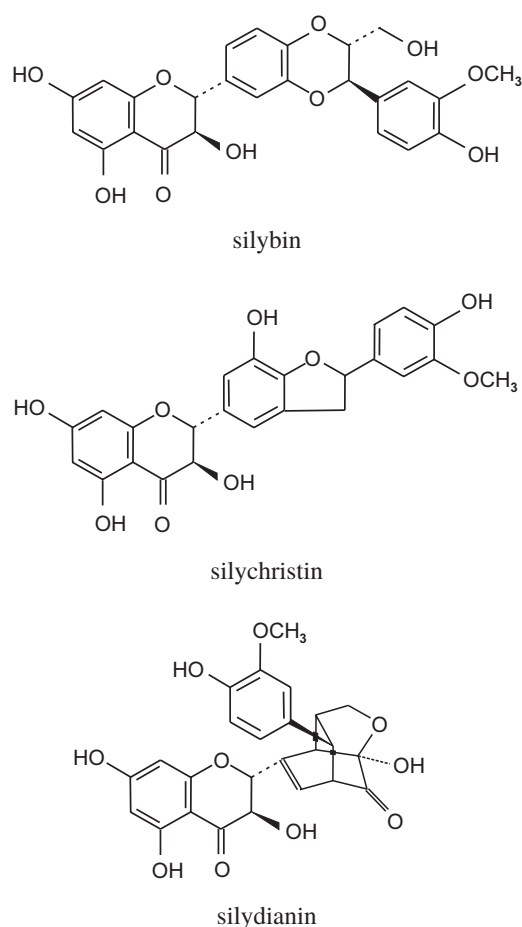
Účinky v trávicím traktu a jejich mechanismus

Pro GIT člověka jsou významné lignany sekoisolariciresinol a matairesinol, které jsou gastrointestinálními bakteriemi transformovány na „živočišné“ fytoestrogeny enterodiol a enterolakton. Ty se absorbují v tenkém střevě a do GIT se vrací ve formě glukuronidů^{24,25}. V GIT působí jako antioxidanty, modulátory proliferace a apoptosu buněk střevního epitelu a interagují s vazebným místem estrogenního receptoru typu II. Flavonoidy jsou v rostlinách přítomny převážně jako glyko-

sidy, které jsou tepelně stabilní. Glykosylované flavonoidy jsou hydrolyzovány v tenkém střevě dvěma β -glukosidasami (laktasou-florizinhydrolasou a cytosolickou β -glukosidasou) (cit.^{26,27}). V aktivitě glykosidas jsou u jednotlivců výrazné rozdíly, které jsou určující pro biodostupnost flavonoidů²⁷. Flavonoidy jsou z GIT absorbovány buď jako intaktní glykosidy nebo aglykony^{7,28}. Většina glykosidů je hydrolyzována bakteriálními enzymy v tlustém střevě (β -glukosidasa, β -glukuronidasa, β -rhamnosidasa) na aglykony^{29,30}. Konečnými metabolity bakteriální konverze flavonů, flavonolů a flavanolů jsou kyseliny 3,4-dihydroxyfenylacetová, 3-hydroxyfenylacetová, 3-hydroxyfenylpropanová a hippurová kyselina, vznikající po štěpení heterocyklického kruhu⁷. Jejich předpokládaný příznivý účinek na epitel tlustého střeva nebyl však experimentálně potvrzen. Katechiny a kondenzované tanniny se téměř neabsorbují, jsou metabolizovány bakteriální flórou tlustého střeva na jednoduché fenolové kyseliny^{31,32}. U pacientů, kterým bylo 3× denně podáváno sondou 100 mg katechinů z *Camellia sinensis* (čaje), došlo k významnému snížení pH v tlustém střevě a změnám ve složení bakteriální flóry³³. Katechiny lze řadit mezi prebiotika.

Řada flavonoidů (např. genistein, kvercetin, naringenin, rutin), rostlinných extraktů bohatých na flavonoidy a silymarin, vykazují gastroprotektivní aktivitu v experimentálních modelech akutního žaludečního vředu (erozní gastritidy). U indomethacinem vyvolané gastritidy dochází ke snížení tvorby mukosy a zeslabení její vrstvy na povrchu žaludeční sliznice a ke snížení tvorby hydrogenuhlčitanu sodného. Jako důsledek inhibice cyklooxygenasy-1 (COX-1) je v metabolismu arašidonové kyseliny preferována lipoxigenasová cesta. Tím dochází ke zvýšené tvorbě leukotrienů podporujících zánět. Protektivní účinek flavonoidů je připisován jejich schopnosti inhibovat lipoxigenasy a tím modifikovat produkci eikosanoidů přes kaskádu arašidonové kyseliny^{34,35}. Významný je rovněž jejich antioxidační účinek (eliminace kyslíkatých radikálů, aktivace antioxidačních enzymů, např. glutathionperoxidasy a antilipoperoxidační aktivita). Silymarin významně snižoval makroskopické poškození sliznice tlustého střeva vyvolané u potkanů trinitrobenzensulfonovou kyselinou a lze předpokládat jeho protektivní účinek u toxické a ulcerózní kolitidy³⁶. Silymarin snížil aktivitu střevní myeloperoxidasy, tvorbu lipoperoxidačních produktů a zlepšil antioxidační statut GIT. Flavonoidy v GIT působí rovněž jako protizánětlivé látky inhibicí exprese střevní indukibilní NO-syntasy a cyklooxygenasy-2 (COX-2) (cit.³⁷). Zejména inhibice COX-2, enzymu, jehož exprese je spojena s progresivní indukci neoplasie, může být významná v prevenci karcinomů tlustého střeva. Kolorektální mukosa je velmi citlivá na karcinogeny. Aditivní inhibice COX-2 flavonoidy a nesteroidními antiflogistiky potencuje v tlustém střevě chemoprotektivní potenciál obou skupin látek³⁸. Flavonoidy potlačují stimulaci imunitního systému mukosy metabolity komensálních (synbiotických) střevních bakterií³⁹.

Některé flavonoidy, např. ze skořice (*Cinnamomum zeylanicum*) nebo česneku (*Allium sativum*), jsou antimikrobiálně účinné vůči *Helicobacter pylori*, bakterii, která je příčinou neerozivní gastritidy⁴⁰. Longitudinální epidemiologická studie holandské populace (muži a ženy ve věku 55 až 69 let) prokázala statisticky významný inverzní vztah mezi spotřebou cibule (flavonol kvercetin)/póru (flavonol kemferol) a relativním rizikem nádorového onemocnění žaludku⁴¹. V *in vitro*



Obr. 3. Flavonolignany silymarinového komplexu

studiích byl prokázán inhibiční efekt fenolových kyselin (di- a trihydroxybenzoové, kávové, ferulové, chlorogenové) a různých flavonoidů na aktivitu trávicích enzymů, trypsinu a α -amylasy^{42,43}. Fyziologické důsledky těchto aktivit při konzumaci stravy bohaté na fenolové látky nejsou objasněny. Kvercetin (flavonol) a apigenin (flavon) stimulují relaxaci hladkého svalstva inhibicí influxu vápenatých iontů do buněk a inhibují uvolňování acetylcholinu. V alternativním lékařství jsou rostlinné extrakty bohaté na kvercetin a apigenin používány jako spasmolytika¹³. Většina fenolových látek vykazuje *in vitro* spektrum antimikrobiálních aktivit, z čehož je vyvozován jejich možný pozitivní vliv na složení a metabolismus střevní mikroflóry. Prozatím však není přesvědčivě doloženo⁷.

Na buněčných liniích odvozených od lidských nádorů tlustého střeva byl prokázán antiproliferativní efekt 26 flavonoidů ze skupin flavonů, flavonolů, flavanonů a isoflavonů ($IC_{50} = 50\text{--}200\ \mu\text{M}$), který nebyl provázen cytotoxicitou²⁹. Ze studie však nevyplynuly zřejmé vztahy mezi strukturou a účinností či selektivitou testovaných látek, flavony obsahující jednu nebo dvě hydroxyskupiny byly neúčinné. Mechanismus účinku flavonoidů, studovaný na nádorové linii HT-29 a transformovaných myších kolonocytech, předpokládá stimulaci apoptosu a buněčné diferenciace i inhibici buněčného cyklu zásahem do transkripce mRNA genů zúčastněných v těchto procesech⁴⁴. Rovněž fytoestrogenní metabolity liganů, enterolakton a enterodiol, významně inhibovaly růst uvedených nádorových buněk²⁴. Silymarin podávaný v dietě potkanům účinně chránil před vznikem nádoru tlustého střeva indukovaného azoxymethanem⁴⁵. Silymarin indukoval apoptosu buněk adenokarcinomu, snižoval aktivitu β -glukuronidasy a tvorbu prostaglandinu E_2 a polyaminů ve střevní mukose. Citované výsledky potvrzují chemopreventivní účinek flavonoidů v tlustém střevě.

4. Fytosteroly

Fytosteroly jsou přirozenou součástí olejů ze semen řady rostlin; bohatým zdrojem jsou např. semena dýně (*Cucurbitae pepo*) (cit.⁴⁶). Přidávají se do rostlinných máseel (FLORA Active), která jsou doporučována jako funkční potravina v prevenci kardiovaskulárních chorob. Studie biologické aktivity fytosterolů se koncentrovaly na jejich vliv na metabolismus lipidů – snížení celkového a LDL-cholesterolu⁴⁷. V poslední době byl výzkum zaměřen na objasnění jejich možné protinádorové aktivity a účinku na metabolismus bakteriální flóry tlustého střeva.

V ý s k y t a s t r u k t u r a

Biogeneze fytosterolů u fotosyntetických organismů je až po vznik skvalenu identická s biosyntézou cholesterolu u obratlovců. Bylo popsáno více než 200 různých steroidů rostlinného původu. Většina fytosterolů obsahuje 27 až 29 uhlíkových atomů a jednu až dvě dvojné vazby. Nejrozšířenější jsou kampesterol, β -sitosterol a stigmasterol (obr. 4). Hydrogenací dvojné vazby Δ^5 -sterolů v poloze C-5 vznikají dihydroderiváty fytosterolů, tzv. stanoly. Kromě volných fytosterolů se vyskytují rovněž čtyři typy konjugátů, ve kterých je 3β -OH skupina esterifikována (mastnou kyselinou nebo skořicovou kyselinou) nebo glykosylována (nejčastěji glukosou nebo jejím derivátem esterifikovaným na C-6 vyšší mastnou kyselinou) (cit.⁴⁷).

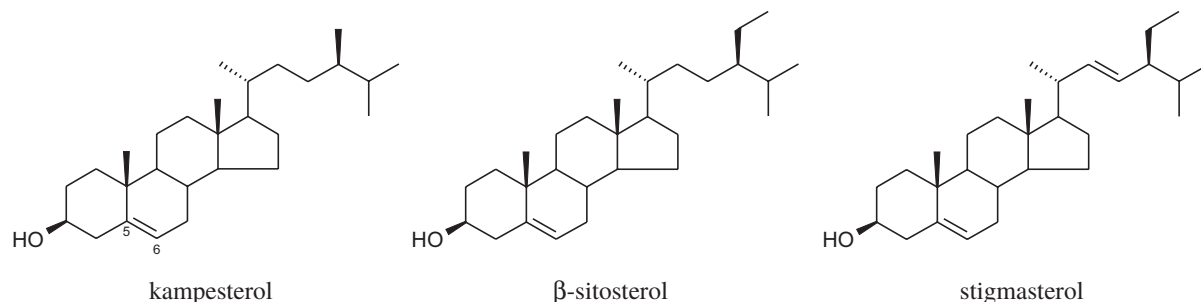
M e t o d y s t a n o v e n í

Stanovení celkových fytosterolů v rostlinném materiálu zahrnují extrakci nepochlupnými rozpouštědly (obvykle hexanem), hydrolyzu konjugátů (esterů nebo glykosidů) a kvantifikaci volných nebo derivatizovaných sterolů ve formě trimethylsilyl/acetylderivátů kapilární plynovou chromatografií (GC/GC-MS). Byly popsány metody využívající HPLC na reverzní fázi. Jejich rozlišení a citlivost však nedosahuje parametrů plynové chromatografie⁴⁷.

Ú č i n k y v t r á v í c í m t r a k t u a j e j i c h m e c h a n i s m u s

Fytosteroly se v tenkém střevě absorbují jen v omezené míře, přibližně 95 % fytosterolů přijatých potravou přechází do tlustého střeva, kde je menší část metabolizována bakteriálními enzymy (zejména cholesteroldehydrogenasou). Metabolity, převážně hydrogenované steroly (stanoly) a 3-oxosteroly, jsou spolu s netransformovanými fytosteroly vylučovány stolicí⁴⁸. Studie na dobrovolnících konzumujících ztužené rostlinné oleje obohacené fytosteroly (8,6 g fytosterolů na den) potvrdila, že fytosteroly nemají prebiotický účinek a výrazně neovlivňují složení a metabolismus střevní mikroflóry⁴⁹.

Dominantním a detailně prostudovaným účinkem fytosterolů v trávicím traktu je inhibice intestinální absorpce cholesterolu^{46,47}. Řada experimentálních studií dokumentuje protinádorovou aktivitu fytosterolů ve střevě⁴⁶. Dieta obohacená β -sitosterolem (0,2–0,3 %) vedla u potkanů ke snížení vzniku nádorů indukovaných methylnitrosomočovinou. Dietní fytosteroly byly rovněž schopny zvrátit u myší hyperproliferaci



Obr. 4. Významné fytosteroly

sliznice tlustého střeva vyvolanou dietou obohacenou cholesterolem. Mechanismus protinádorového účinku fytoosterolů však nebyl objasněn. Dosavadní poznatky naznačují, že fytoosteroly potlačují bakteriální transformace cholesterolu a sekundárních žlučových kyselin v tlustém střevě a tím tvorbu metabolitů, které jsou považovány za nádorové promotory v tlustém střevě^{46,49}. Jedna z nejrozsáhlejších epidemiologických studií (Netherlands Cohort Study on Diet and Cancer), do které bylo zařazeno 120 852 subjektů, však nepotvrdila statisticky významný vztah mezi vysokým příjmem rostlinných sterolů v potravě a sníženým rizikem kolorektálních karcinomů. Výsledkem studie je konstatování, že dietní fytoosteroly v denní dávce do 400/500 mg na den (ženy/muži) pravděpodobně nejsou účinné v prevenci nádorů tlustého střeva⁶.

5. Oligo- a polysacharidy s β -glykosidovou vazbou

Oligo- a polysacharidy mají v rostlinách funkci zásobních látek (např. škrob a inulin), strukturních elementů buněčných stěn (např. celulósa) a jiné, např. ochranné funkce (slizy) (cit.⁵⁰). Rostlinné sacharidy se mezi sebou liší zastoupením jednotek (glukosa, fruktosa, galakturonová kyselina), větvením řetězců a konfigurací glykosidové vazby (α/β). Oligo- a polysacharidy s α -glykosidovou vazbou jsou hydrolyzovatelné již v horní části GIT, zatímco většina sacharidů s β -glykosidovou vazbou se štěpí až v tlustém střevě.

Výskyt a struktura

Oligo- a polysacharidy s β -glykosidovou vazbou jsou zásobními cukry rostlin zejména čeledí *Asteraceae*, *Boraginaceae*, *Campanulaceae*, *Liliaceae* a *Poaceae*⁵⁰. Ve své molekule mají fruktosu a glukosu a pro jejich směsi izolované z rostlin se užívá název glukofruktany nebo fruktany, obsahují-li pouze fruktosu. Jako zdroje fruktanů jsou známy artyčok zeleninový (*Cynara scolymus*), čekanka obecná (*Cichorium intybus*), smetánka lékařská (*Taraxacum officinale*), topinambur (*Helianthus tuberosus*) a jakon (*Smallanthus sonchifolius*). Fruktany lze zařadit do tří strukturních skupin: i) lineární β -(2 $\rightarrow$ 6) polymery – levany, ii) rozvětvené β -(2 $\rightarrow$ 6)

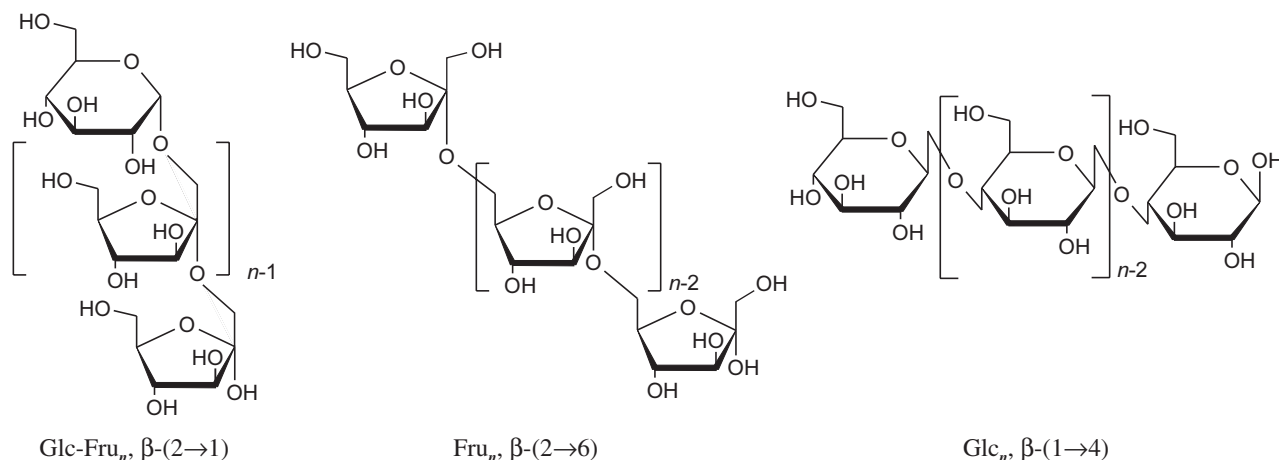
a β -(2 $\rightarrow$ 1) polymery a iii) lineární β -(2 $\rightarrow$ 1) polymery s malým výskytem větvení – inuliny (obr. 5). Většina inulinů představuje směs oligomerů a polymerů, ve kterých je fruktofuranosový řetězec ukončen glukosou připojenou α -(1 $\rightarrow$ 2) vazbou na terminální části molekuly. Polymerační stupeň nativního inulinu z čekanky je mezi 5 a 65, s průměrem 10. Po odstranění nízkopolymerní složky získáme tzv. HP inulin s průměrným polymeračním stupněm okolo 25. K dalším rostlinným cukrům s β -glykosidovou vazbou patří oligosacharidy galaktosy, xylooligosacharidy a galaktosidy raffinosa a stachyosa. Polysacharidy se získávají z rostlin extrakcí horkou vodou. Pro potravinářské účely jsou některé β -oligosacharidy vyráběny semisynteticky buď hydrolyzou polysacharidů nebo biotechnologickými postupy ze sacharosy nebo laktosy (tabulka I, cit.⁵¹).

Metody stanovení

Oligosacharidy se stanovují pomocí HPLC na stacionární fázi Lichrospher 100-5, NH_2 s mobilní fází acetonitril/ H_2O (7:3) při teplotě 24 °C a RI detekcí. Touto metodou lze stanovit v inulinu jednotlivé fruktany až do GF_{10} vedle sacharosy, glukosy a fruktosy. Glukosu a fruktosu, které se touto metodou špatně dělí, lze stanovit na koloně se stacionární fází „Polymer IEX Ca^{2+} form“ ve vodě jako mobilní fázi a RI detekcí. Inulin s vyšším polymeračním stupněm se stanovuje na koloně „Carbo Pac PA1“ v gradientu NaOH/natrium acetát pulzní amperometrickou detekcí s Au elektrodou⁵².

Účinky v trávicím traktu a jejich mechanismus

Oligo- a polysacharidy s β -glykosidovou vazbou patří z pohledu jejich funkce v GIT mezi rozpustné vlákniny. Nerozpustná vláknina (např. celulósa) stimuluje peristaltiku střeva, zkracuje dobu průchodu potravy trávicím traktem, zvyšuje objem stolice a zadržuje ve stolici vodu, váže žlučové kyseliny a tím zvyšuje obrát cholesterolu v organismu⁵³. Nerozpustná vláknina se vylučuje beze změny stolicí. Na rozdíl od nerozpustné (fermentaci nepodléhající) vlákniny jsou β -sacharidy v tlustém střevě hydrolyzovány a štěpeny bakteriální flórou. Jsou to zejména bakterie rodů *Bifidobacterium* a *Lactobacil-*



Obr. 5. Některé nestravitelné β -oligo- a polysacharidy

Tabulka I

Přehled oligosacharidů s potenciálním prebiotickým účinkem

Oligosacharid	Struktura	Vazba	Proces	Původ
Fruktooligosacharidy	$(\text{Fru})_n\text{-Glc}$	$\beta\text{-(2}\rightarrow\text{1)}$, $\alpha\text{-(1}\rightarrow\text{2)}$	syntéza	sacharosa
	$(\text{Fru})_m\text{-(Fru)}_n\text{-Glc}$	$\beta\text{-(2}\rightarrow\text{1)}$	hydrolyza	inulin
	$(\text{Fru})_m\text{-(Fru)}_n\text{-Glc}$	$\beta\text{-(2}\rightarrow\text{1)}$, $\beta\text{-(2}\rightarrow\text{6)}$	hydrolyza	cereálie
Galaktooligosacharidy	$(\text{Gal})_n\text{-Glc}$	$\beta\text{-(1}\rightarrow\text{4)}$, $\beta\text{-(1}\rightarrow\text{6)}$	syntéza	laktosa
Laktulosa	Gal-Fru	$\beta\text{-(1}\rightarrow\text{4)}$	isomerizace	laktosa
Laktosacharosa	Gal-Glc-Fru	$\beta\text{-(1}\rightarrow\text{4)}$	syntéza	laktosa
Oligosacharidy sojových bobů	$(\text{Gal})_n\text{-Glc-Fru}$	$\alpha\text{-(1}\rightarrow\text{6)}$, $\alpha\text{-(1}\rightarrow\text{2)}$	hydrolyza	soja
Glukooligosacharidy	$(\text{Glc})_n$	$\alpha\text{-(1}\rightarrow\text{2)}$, $\alpha\text{-(1}\rightarrow\text{6)}$	syntéza	sacharosa
	$(\text{Glc})_n$	$\beta\text{-(1}\rightarrow\text{3)}$	hydrolyza	chaluhy
Isomaltooligosacharidy	$(\text{Glc})_n$	$\alpha\text{-(1}\rightarrow\text{6)}$	hydrolyza	škrob
Xylooligosacharidy	$(\text{Xyl})_n$	$\beta\text{-(1}\rightarrow\text{4)}$	hydrolyza	cereálie

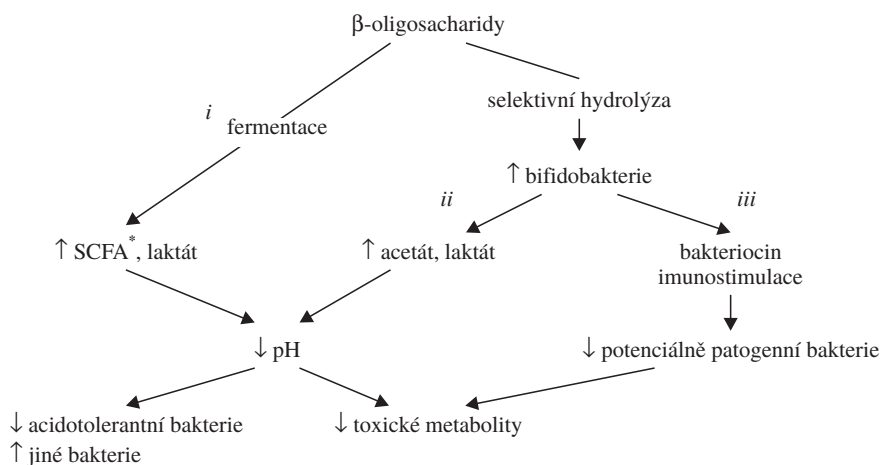
lus, které jsou považovány za indikátory vyvážené střevní mikroflóry a štěpí β -sacharidy za vzniku nižších karboxylových kyselin (máslé, mléčné, propionové a octové), oxidu uhličitého, methanu a vodíku^{11,54}. Nižší karboxylové kyseliny jsou hlavním energetickým zdrojem pro sliznici tlustého střeva, mají zásadní význam pro výživu, obnovu, diferenciaci a ochranu kolonocytů a snižují hodnotu pH (cit.⁵⁵). Jejich další příznivé účinky spočívají v ovlivnění intestinální absorpce živin (snižují vstřebávání glukosy, triacylglycerolů a cholesterolu, což vede ke snížení plazmatických hladin těchto látek) a zlepšují morfologii střevních klků. Podporují růst bifidobakterií a laktobacilů doprovázený poklesem populací patogeních a potenciálně patogenních bakterií rodů *Bacteroides*, *Clostridium* a enterobakterií^{11,54}. Na modelu potkanů, ale i na jiných zvířecích druzích, prasatech a drůbeži, bylo potvrzeno, že malé množství oligosacharidů (0,2–2 % fruktooligosacharidů, galaktooligosacharidů nebo laktulosity, disacharidu vyráběného z laktosy) v dietě je schopno udržet potenciálně patogenní bakterie na velmi nízkých hladinách^{11,54}.

Ve snaze vysvětlit změny v bakteriálních populacích byly navrženy tři mechanismy: i) rychlá fermentace oligosacharidů střevními bakteriemi, která vede k tvorbě velkého množství

mastných kyselin o krátkém řetězci (C2–C4). Následný pokles pH v tlustém střevě pak stimuluje růst bifidobakterií a laktobacilů odolných vůči kyselému prostředí, zatímco bakterie na toto prostředí citlivé (např. klostridia, *Escherichia coli*) jsou potlačeny, ii) selektivní hydrolyza oligosacharidů bifidobakteriemi způsobuje pokles střevního pH jako důsledek tvorby metabolitů, hlavně acetátu a laktátu, iii) některé bakterie fermentující oligosacharidy produkují látku podobnou bakteriocinu, který inhibuje růst klostridií, *E. coli* a mnoha jiných patogenních bakterií (obr. 6, cit.⁵⁴).

Snížení hodnoty pH v důsledku fermentace oligosacharidů v tlustém střevě a absorpce mastných kyselin o krátkém řetězci zlepšuje intestinální absorpci vápníku, hořčíku a železa, a tím podporuje kalcifikaci kostí. Studie na potkanech ukázaly, že oligofruktosa zlepšuje vstřebávání vápníku a hořčíku v tenkém střevě^{55,56}. U zdravých lidí dávka oligosacharidů 15–40 g na den zvyšuje absorpci vápníku^{57,58}.

Oligosacharidy ovlivňují pozitivně sekreci inzulinu, a tím redukuje postprandiální glykémii (zvýšení hladiny glukosy v krvi po jídle), což naznačuje, že tyto látky by mohly být využity jako náhradní sladidla⁵⁹. Fruktooligosacharidy s dlouhým řetězcem (dávka 8–14 g na den) snižují rovněž choleste-

Obr. 6. Účinky β -oligosacharidů na mikroflóru tlustého střeva; * nižší karboxylové kyseliny

rolémii, LDL-cholesterol nebo triacylglycerolémii u zdravých a diabetických subjektů^{60,61}. Oligosacharidy snižovaly počet střevních žlázových struktur, jejichž vznik byl u potkanů a myši vyvolán dimethylhydrazinem (DMH), 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]chinolinem nebo azoxymethanem⁵⁴. Synergický účinek byl pozorován, pokud byly v dietě oligosacharidy (prebiotikum) a bifidobakterie (probiotikum). U potkana byl sledován protinádorový účinek prebiotik na vyvolání kolorektálního karcinomu podáváním DMH (cit.^{62,63}). Efekt se zvyšoval v řadě oligofruktosa, inulin, HP inulin. Při použití kombinace HP inulinu s *Bifidobacterium longum* došlo k poklesu o cca 70 % ve srovnání s 20 % při použití jen probiotika či prebiotika⁶⁴, což potvrdilo synergické působení kombinovaných přípravků (synbiotik) (cit.⁶⁵). Preventivní význam rozpustné vlákniny pro snížení rizika vzniku kolorektálního karcinomu byl prokázán v několika klinických a epidemiologických studiích^{2,65,66}.

6. Závěr

Přehled literárních dat podporuje účelnost pravidelného denního příjmu polyfenolů, fytosterolů a nestravitelných oligo- a polysacharidů v dietě ve formě funkční potraviny/potravního doplňku. Jejich pozitivní fyziologické účinky na funkci trávicího traktu živočichů jsou násobeny jejich chemoprotektivním účinkem, snižujícím významně riziko vzniku nádorových onemocnění. Kauzální vysvětlení účinků v článku diskutovaných fytochemikálií na gastritidy, ulcerózní kolitidu, modulaci proliferace a apoptosu epitelálních buněk, imunomodulaci, složení mikroflóry GIT, absorpci živin či peristaltickou funkci střev vychází z experimentů na buněčných modelech nebo zvířatech a je aplikováno na člověka. Na rozdíl od dietní vlákniny⁵³, nejsou pro polyfenolové látky a fytosteroly dostatečně známy jejich doporučené denní dávky. Přes všechny tyto ne vždy dostatečně vědecky doložené poznatky (zejména schází více klinických studií) lze pozitivní účinky přírodních fenolových látek, sterolů a nestravitelných β-oligo- a polysacharidů na GIT člověka považovat za průkazné.

Autoři děkují za finanční podporu MŠMT ČR (grant MSM 151100003) a MPO ČR (grant FD-K/096).

LITERATURA

- Johnson I. T.: Proc. Nutr. Soc. 60, 481 (2001).
- La Vecchia C., Chatenoud L., Altieri A., Tavani A.: Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. 11, 10 (2001).
- Hathcock J.: J. Nutr. 131, 1114S (2001).
- Vyhláška Ministerstva zemědělství č. 23/2001 Sb., kterou se stanoví druhy potravin určené pro zvláštní výživu a způsob jejich použití (MZe 2001).
- European Parliament and Committee: Directive 96/84/EC on the approximation of the Laws of the Member States Relating Intended to Foodstuffs for Particular Nutritional Uses (EC 1996).
- Normén A. L., Brants H. A. M., Voorrips L. E., Andersson H. A., van den Brandt P. A., Goldbohm R. A.: Am. J. Clin. Nutr. 74, 141 (2001).
- Puupponen-Pimiä R., Aura A.-M., Oksman-Caldentey K.-M., Myllärinen P., Saarela M., Mattila-Sandholm T., Poutanen K.: Trends Food Sci. Technol. 13, 3 (2002).
- Belluzzi A.: Proc. Nutr. Soc. 61, 391 (2002).
- Wenk C.: WPSA, Bremen, 17.6.2002.
- Frič P.: Z. Gastroenterology 40, 197 (2002).
- Guarner F., Malagelada J.-R.: Lancet 361, 512 (2003).
- Herbert R. B.: The Biosynthesis of Secondary Metabolites. Chapman and Hall, London 1989.
- Middleton E., Kandaswami C., Theoharides T. C.: Pharmacol. Rev. 52, 673 (2000).
- Tapiero H., Tew K. D., Nguyen Ba G., Mathé G.: Biomed. Pharmacother. 56, 200 (2002).
- Vinson J. A., Proch J., Bose A.: Methods Enzymol. 335, 103 (2001).
- Zheng W., Wang S. Y.: J. Agric. Food Chem. 49, 5165 (2001).
- Klejduš B., Vitamvášová-Štěrbová D., Kubáň V.: Anal. Chim. Acta 450, 81 (2001).
- Grynová L., Jandera P., Škopová G., Horna A.: Chem. Listy 96, 467 (2002).
- Jirovský D., Horáková D., Kotouček M., Valentová K., Ulrichová J.: J. Sep. Sci. 26, 739 (2003).
- Suntornsuk L.: J. Pharm. Biomed. Anal. 27, 679 (2002).
- Kvasnička F., Biba B., Ševčík R., Voldřich M., Krátká J.: J. Chromatogr., A 990, 239 (2003).
- Maleš Ž., Medić-Šarić M.: J. Pharm. Biomed. Anal. 24, 353 (2001).
- Packer L.: Methods Enzymol. 335, (2001).
- Wang L.-Q.: J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 25, 289 (2002).
- Ford J. D., Davin L. B., Lewis N. G.: Plant Lignans and Health: Cancer Chemoprevention and Biotechnological Opportunities. Plant Phenolics 2, str. 675. Kluwer Academic, New York 1999.
- Scalbert A., Morand C., Manach C., Rémésy C.: Biomed. Pharmacother. 56, 276 (2002).
- Németh K., Plumb G. W., Berrin J.-G., Juge N., Jacob R., Naim H. Y., Williamson G., Swallow D. M., Kroon P. A.: Eur. J. Nutr. 42, 29 (2003).
- Gee J. M., Johnson I. T.: Curr. Med. Chem. 8, 1245 (2001).
- Kuntz S., Wenzel U., Daniel H.: Eur. J. Nutr. 38, 133 (1999).
- Aura A.-M., O'Leary K.A., Williamson G., Ojala M., Bailey M., Puupponen-Pimiä R., Nuutila A. M., Oksman-Caldentey K.-M., Poutanen K.: J. Agric. Food Chem. 50, 1725 (2002).
- Wang L.-Q., Meselhy M. R., Li, Y., Nakamura N., Min B.-S., Qin G.-W., Hattori M.: Chem. Pharm. Bull. 49, 1640 (2001).
- Déprez S., Brezillon C., Rabot S., Philippe S., Mila I., Lapiere C., Scalbert A.: J. Nutr. 130, 2733 (2000).
- Hara Y. J.: Cell Biochem. Suppl. 27, 52 (1997).
- Khayyal M. T., El-Ghazaly M. A., Kenawy S. A., Seif-El-Nasr M., Mahran L. G., Kafafi Y. A. H., Okpanyi S. N.: Arzneim.-Forsch./Drug Res. 51, 545 (2001).
- La Casa C., Villegas I., Alarcón de la Lastra C., Motilva V., Martín Calero M. J.: J. Ethnopharmacol. 71, 45 (2000).
- Cruz C., Galvez J., Crespo E., Ocete M. A., Zarzuelo A.: Planta Med. 67, 94 (2001).
- Raso G. M., Meli R., Di Carlo G., Pacilio M., Di Carlo R.: Life Sci. 68, 921 (2001).

38. Patrignani P.: *Toxicol. Lett.* 112–113, 493 (2000).
39. Podolsky D. K.: *New Engl. J. Med.* 347, 417 (2002).
40. Fukai T., Marumo A., Kaitou K., Kanda T., Terada S., Nomura T.: *Life Sci.* 71, 1449 (2002).
41. Dorant E., van den Brandt P. A., Goldbohm R. A., Sturmans F.: *Gastroenterology* 110, 12 (1996).
42. Rohn S., Rawel H. M., Kroll J.: *J. Agric. Food Chem.* 50, 3566 (2002).
43. Maliar T., Jedinák A., Šturdík E.: *Chem. Listy* 96, S126 (2002).
44. Wenzel U., Kuntz S., Brendel M. D., Daniel H.: *Cancer Res.* 60, 3823 (2000).
45. Kohno H., Tanaka T., Kawabata K., Hirose Y., Sugie S., Tsuda H., Mo H.: *Int. J. Cancer* 101, 461 (2002).
46. Moreau R. A., Whitaker B. D., Hicks K. B.: *Prog. Lipid Res.* 41, 457 (2002).
47. Ling W. H., Jones P. J. H.: *Life Sci.* 57, 195 (1995).
48. Weststrate J. A., Ayes R., Bauer-Plank C., Drewitt P. N.: *Food Chem. Toxicol.* 37, 1063 (1999).
49. Ayes R., Weststrate J. A., Drewitt P. H., Hepburn P. A.: *Food Chem. Toxicol.* 37, 1127 (1999).
50. Bruneton J.: *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants*, str. 55. Lavoisier Publishing, Paris 1993.
51. Roberts S. M.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* 2000, 611.
52. Valentová K., Přikrylová V., Křen V., Halada P., Ulrichová J., Šimánek V.: *Chem. Listy* 96, 496 (2002).
53. Zádák Z.: www.mednet.cz/výživa/výživa3.htm (2000), 15.3.2003.
54. Collins M. D., Gibson G. R.: *Am. J. Clin. Nutr.* 69, 31052 (1999).
55. Suzuki T., Hara H., Kasai T., Tomita F.: *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 62, 837 (1998).
56. Ohta A., Motohashi Y., Sakai K., Hirayama M., Adachi T., Sakuma K.: *Scand. J. Gastroenterol.* 33, 1062 (1998).
57. Coudray C., Bellanger J., Castiglia-Delavaud C., Remesy C., Vermorel M., Rayssiguier Y.: *Eur. J. Clin. Nutr.* 51, 375 (1997).
58. Van den Heuvel E., Schoterman M. H. C., Muijs T.: *J. Nutr.* 130, 2938 (2000).
59. Oku T., v knize: *Functional Foods, Designer Foods, Pharmafoods, Nutraceuticals* (Goldberg I., ed.), str. 202. Chapman and Hall, New York 1994.
60. Williams C. M.: *J. Nutr.* 129, 1471 (1999).
61. Davidson M. H., Maki K. C.: *J. Nutr.* 129, 1474 (1999).
62. Reddy D. S., Hamid R., Rao C. V.: *Carcinogenesis* 18, 1371 (1997).
63. Verghese M., Rao D. R., Chawan C. B., Williams L., Shackelford L.: *J. Nutr.* 132, 2809 (2002).
64. Verghese M., Rao D. R., Chawan C. B., Shackelford L.: *J. Nutr.* 132, 2804 (2002).
65. Modler H. W.: *Int. Dairy J.* 4, 383 (1994).
66. Van Loo J., Jonkers N.: *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 11, 87 (2001).

M. Modrianský^a, K. Valentová^a, V. Přikrylová^b, and D. Walterová^a (^a*Institute of Medical Chemistry and Biochemistry, Faculty of Medicine, Palacký University, Olomouc*, ^b*Laboratory of Biotransformations, Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*): **Natural Substances in the Prevention of Gastrointestinal Diseases**

Some polyphenols such as lignans, flavonoids, and flavonolignans, phytosterols, and non-digestible oligo- and polysaccharides were shown to have *in vitro* and *in vivo* chemopreventive and other positive physiological effects on the epithelium and metabolic processes in the gastrointestinal tract (GIT) of humans. Most of these substances are metabolized in the colon; some of them stimulate bifidogenic bacteria and Lactobacilli. It was proved that sufficient daily intake of these phytochemicals shows beneficial effects on cancerogenesis in stomach and colon. Functional foods and dietary supplements that contain these substances may play an important role at present when the incidence of cancer diseases of GIT increases.

BIOLOGICKÁ A CHEMICKÁ VARIABILITA MAKY A JAKONU

ALEŠ LEBEDA^a, IVANA DOLEŽALOVÁ^a,
KATEŘINA VALENTOVÁ^b,
MARTA DZIECHCIARKOVÁ^a,
MARIE GREPLOVÁ^c, HANA OPATOVÁ^d
a JITKA ULRICHOVÁ^b

^aKatedra botaniky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc, ^bÚstav lékařské chemie a biochemie, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc, ^cVýzkumný ústav bramborářský, s.r.o., Dobrovského 2366, 580 01 Havlíčkův Brod, ^dÚstav konzervace potravin a technologie masa, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 3, 166 28 Praha 6
e-mail: lebeda@prfholt.upol.cz

Došlo 7.4.03, přepracováno 20.5.03, přijato 28.5.03.

Klíčová slova: andské plodiny, *Lepidium meyenii*, *Smallanthus sonchifolius*, morfologické a výnosové znaky, *in vitro* kultury, isoenzymy, obsahové látky, funkční potraviny

Obsah

1. Úvod
2. Variabilita morfologických a výnosových znaků
3. Pěstování maky *in vitro*
4. Polymorfismus isoenzymů
5. Analýza obsahových látek a jejich účinky
6. Technologie zpracování hlíz jakonu
7. Závěr

1. Úvod

V souvislosti s otevřením trhu začátkem 90. let 20. století a jeho obohacením o nové druhy ovoce a zeleniny pocházející z různých geografických oblastí světa, byly znovu objeveny plodiny u nás do té doby jen velmi málo známé. Zatímco obě zeleniny maky (*Lepidium meyenii* Walp.) i jakon (*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Robins.) byly po druhé světové válce oblíbeny a pěstovány hlavně v západní Evropě (Itálie, Německo), do České republiky byly dovezeny až v roce 1993, a možnost jejich pěstování ověřena poprvé v roce 1995 (cit.^{1,2}). Je skutečností, že popularita především jakonu, ale i maky značně vzrostla, a to díky antidiabetickým, nutričním, imunostimulačním a plodnost zvyšujícím vlastnostem jejich podzemních orgánů. Základní dostupné informace týkající se botanických vlastností, biologie a obsahových látek u obou druhů byly přehledně zpracovány v samostatném článku³. Předmětem této práce je shrnutí experimentálních poznatků autorů získaných v letech 2001 a 2002, které se týkají morfologické variability, výnosových parametrů, pěstování v podmínkách *in vitro*, variability proteinových markerů a někte-

rých nutričně významných látek u obou druhů rostlin doplněných o nejnovější údaje ze světové literatury. Poznatky o uvedených znacích a vlastnostech byly dosud poměrně omezené^{3–5}. Proto hlubší poznání těchto znaků a vlastností představuje důležitou část komplexního výzkumu maky a jakonu realizovaného v ČR, jehož cílem bylo využití těchto plodin jako potenciálních funkčních potravin a potravních doplňků dostupných široké veřejnosti³.

2. Variabilita morfologických a výnosových znaků

Studovaný jedinečný soubor zahrnoval 15 genotypů maky (*Lepidium meyenii* Walp.) (tabulka I) pocházejících z Peru a 25 genotypů jakonu (*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Robins.) (tabulka I) dovezených z Nového Zélandu (primárním centrem původu je však Ekvádor). Tyto genotypy

Tabulka I

Variabilita tvaru (morfotypu) podzemních částí maky a jakonu pěstovaných v letech 2001 a 2002

Morfotyp	Rok pěstování/číslo genotypu	
	2001	2002
<i>Hypokotyle maky (L. meyenii), hodnoceno podle cit.¹⁰</i>		
„Kimsa kucho“	13,146	314
„Raku chupa“	13,29,136,145,146, 151,153, 168,265, 280,290,310,314	136,145,151,153, 265,290,Unalm
„Aqochinchay“	136,145,168,290,314	146,265,280
„Achka chupa“	145	
„Ruyru“		168
<i>Kořenové hlízy jakonu (S. sonchifolius), hodnoceno podle cit.²</i>		
1	84	
2		18
4	28,47,51,88,1237	18,25,28,47,51, 57,60,75,83,88, 92,1237
5	5,31,60,74,83,85,92	5,6,17,20,22,25, 31,57,68,85,1237
7	25	
8	83	88
11		17,22,64,68,75, 85,88,92,1237
12	18,22,57,75,88,90	6,18,12,20,25,28, 31,51,60,74,75,84, 88,90,92, 1237
14	6,17,18,20,22,48, 64,68,83,84	17,18,31,14,48,60, 64,68,74,83,84,88

jsou uchovávány jako genové zdroje perspektivních plodin ve Výzkumném ústavu bramborářském, s.r.o., v Havlíčkově Brodě.

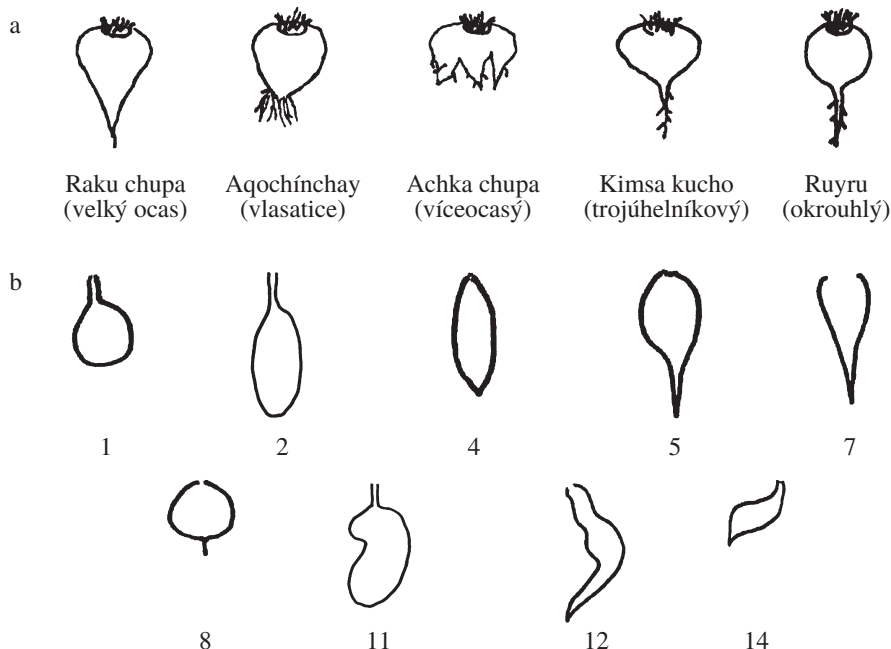
Rostliny byly pěstovány a hodnoceny (květen–říjen 2001 a 2002) v polních podmínkách regionu Haná (Olomouc–Holice, nadmořská výška 210 m). V průběhu vegetace byla průměrná denní teplota v roce 2001 16,3 °C, srážky 271,4 mm; v roce 2002 16,4 °C a srážky činily 387,9 mm. Maka byla pěstována na černé netkané textilií ve sponu 45×45 cm. Každý genotyp byl zastoupen 10 rostlinami. Paralelně byly některé genotypy maky pěstovány ve skleníku (teplota přes den 18–30 °C, v noci 12–16 °C). V roce 2002 byla maka pěstována bez textilie. V bezprostředním okolí rostlin pěstovaných na fólii docházelo k přehřívání folie a půdy, což bylo spojeno s úžehem spodních listů růžice maky. Jakon byl pěstován v hrůbčích, 5 rostlin od každého genotypu, ve sponu 70×70 cm. V průběhu vegetace byl porost ošetřován tradiční agrotechnikou⁶.

Během vegetace byla u obou druhů sledována variabilita nadzemní a podzemní části rostlin^{6–9}. V době sklizně byla u genotypů maky stanovena hmotnost a proveden popis tvaru hypokotylu podle platného deskriptoru¹⁰ s přihlédnutím na morfologický deskriptor ředkvičky¹¹. U podzemní části jakonu byla zjišťována hmotnost kořenových hlíz a kaudexů. Tvar kořenových hlíz byl popsán podle základního morfologického deskriptoru².

Morfologická variabilita hypokotylů maky byla výrazně závislá na ročníku pěstování. U studovaného souboru genotypů maky bylo během obou vegetačních sezón popsáno celkem pět základních tvarů (morfotypů) hypokotylu (tabulka I, obr. 1a). Nejčastější morfotyp maky v roce 2001 „Raku chupa“ byl zaznamenán u 13 genotypů, tvar „Aqochínchay“ u pěti genotypů (tabulka I). Ve druhém roce pěstování patřil k nejčastěji se vyskytujícím morfotypům opět „Raku chupa“ (cel-

kem 17 genotypů), dále pak „Aqochínchay“ (tabulka I). Zároveň u většiny genotypů byly morfotypy hypokotylu variabilní, pouze u šesti genotypů zůstal původní tvar „Aqochínchay“ nezměněn (tabulka I). Z dosud získaných výsledků vyplývá otázka stability, resp. nestability tohoto znaku, tzn. zda si některé genotypy uchovávají svůj morfotyp v různých podmínkách prostředí, nebo jej mění v závislosti na klimatických a půdních faktorech. Rovněž v hmotnosti hypokotylů maky byla zjištěna značná variabilita (obr. 2a). V roce 2001 měly největší hmotnost hypokotylu genotypy 145 a 168, naopak u genotypů 29 a 265 byla zjištěna nejmenší hmotnost hypokotylu^{6–9}. Ve druhém roce pěstování se jako neúspěšnější jevíly genotypy 280 a 265, nejmenší hmotnost hypokotylu měly genotypy 310 a Unalm amarylla (obr. 2a). Největší hmotnost hypokotylu byla v obou letech pěstování zaznamenána u genotypu 265. Ve druhém roce pokusu však byly hodnoceny rostliny, které se vysazovaly na pole až v září, takže hypokotyly byly ve srovnání s prvním rokem malé.

U souboru genotypů jakonu bylo zaznamenáno celkem devět základních morfotypů hlíz (tabulka I, obr. 1b). V roce 2001 byly nejčastěji popsány morfotypy 14, 12, 5 a morfotyp 4. Morfotypy 1, 7 a 8 měl pouze jeden genotyp jakonu^{6–9} (tabulka I). V roce 2002 (tabulka I) se nejčastěji vyskytovaly morfotypy 12, 14, 5, 4 a 11. Morfotypy 2 a 8 byly zaznamenány pouze u jednoho genotypu. Zajímavé je, že u deseti genotypů byly popsány více než dva morfotypy kořenových hlíz, v případě genotypu 88 dokonce pět (tabulka I). Tato skutečnost je rozdílná ve srovnání s rokem 2001, kdy byly jednotlivé genotypy jakonu podstatně homogennější z hlediska morfologické variability tvaru hlíz. Pouze malá část genotypů studovaného souboru měla jednotný tvar hlíz (morfotypy 4, 5, 12 a 14) v obou letech pěstování. V roce 2002 byly nově popsány morfotypy 2 a 11, které se v předchozím roce nevyskytovaly, naopak nebyly zaznamenány morfotypy 1 a 7. Z dosud získa-



Obr. 1. Základní tvary (morfotypy) maky a jakonu zjištěné při studiu morfologické variability; a – hypokotylu maky (*L. meyenii*), podle cit.¹⁰, b – kořenové hlízy jakonu (*S. sonchifolius*), podle cit.²

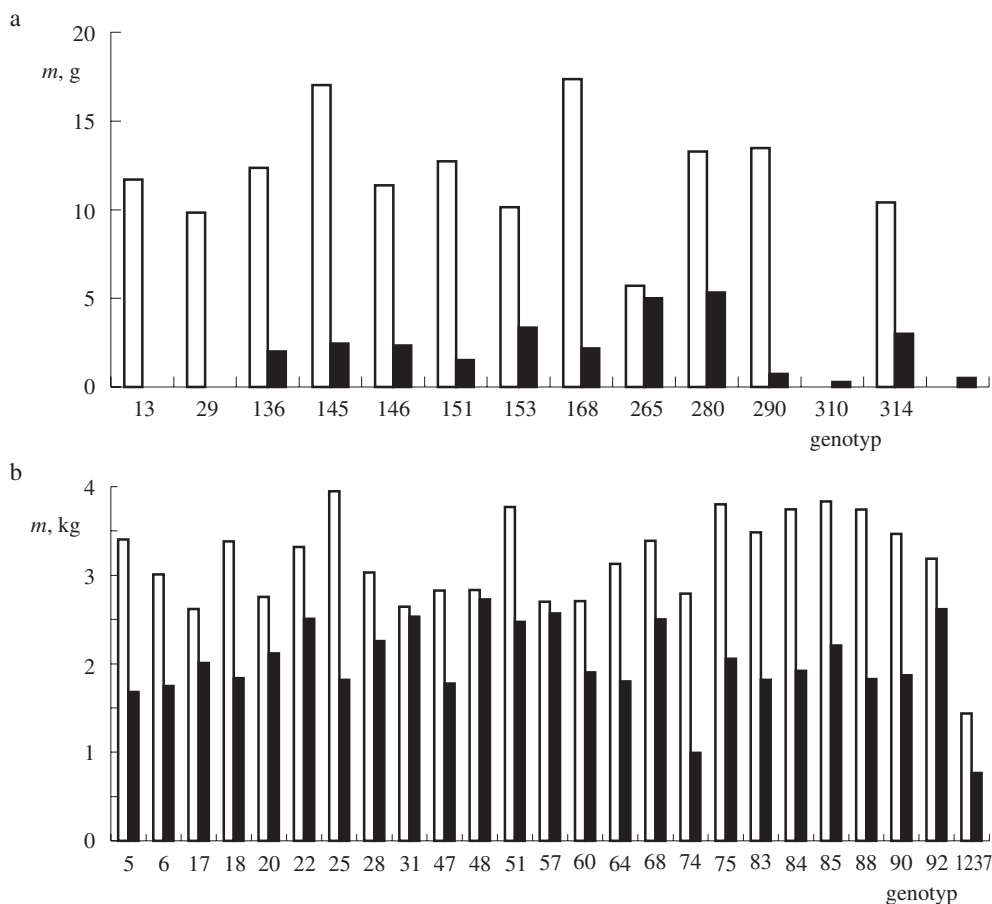
ných výsledků je zřejmé, že stabilita tohoto znaku je poměrně malá a je významně závislá na podmínkách prostředí. Hmotnost kořenových hlíz jakonu se ukázala jako velmi variabilní vlastnost a to jednak mezi jednotlivými genotypy, ale i v rámci ročníků (obr. 2b). V roce 2001 patřily k nejvýnosnějším genotypy 25, 51, 75 a 85, naopak genotyp 1237 měl hmotnost hlíz nejmenší^{6–9}. Podstatně menší byla produkce kořenových hlíz v roce 2002. Nejvýnosnější genotypy byly 48, 92 a 57. Stejně jako v předešlém roce, nejméně výnosný byl genotyp 1237.

Z uvedených výsledků je zřejmé, že u obou rostlin existuje mezi jednotlivými genotypy značná morfologická a výnosová variabilita, která je významně ovlivňována podmínkami prostředí. Vzhledem k tomu, že se jedná o první výsledky zjištěné během dvou let experimentální práce, nelze z nich dělat jednoznačné závěry z hlediska homogenity, stability a vlivu faktorů prostředí. Ukazuje se však, že podmínky prostředí střední Evropy pro pěstování maky nejsou zcela optimální a jejich výkyvy výrazně ovlivňují nejen výnos, ale i kvalitu produktu.

3. Pěstování maky *in vitro*

Experimenty s pěstováním maky v podmínkách *in vitro* byly zahájeny v roce 2001. Maky je v našich podmínkách

dvouletá plodina, která v prvním roce vytváří přízemní listovou růžici, v druhém roce kvete a produkuje semena. Přestože maky poskytuje množství semen, její pěstování v podmínkách *in vitro* nebylo studováno. *In vitro* udržování a klonování maky považujeme za účelné a nezbytné pro případné další výzkumné záměry. Pro zavedení do kultury *in vitro* byla použita povrchově desinfikovaná semena (velikost 0,8 mm). Nejlepší výsledky klíčení byly dosaženy na standardním MS médiu¹² bez přidavku růstových regulátorů. V průběhu 3–4 dnů došlo ke klíčení a vývoji děložních listů. Na médiu MS lze rostlinky ponechat bez pasáže až 3 měsíce, během nichž postupně dochází k odumírání starých listů a přirůstání nových, a tím prodlužování epikotylu. Po zkrácení kořenů mohou být rostliny přeneseny (pasážovány) na čerstvé standardní MS médium, kde pokračují v růstu. Schopnost regenerace spících úžlabních pupenů na epikotylu souvisí s vitalitou daného genotypu. K podpoře růstu výchozích rostlin byl testován přípravek Alar 85 (dimethylhydrazid kyseliny jantarové, SADH) v dávce 0,1–1,5 mg.l⁻¹ média a kinetin (6-furfurylaminopurin, KIN) v koncentraci 0,1–10 µM. Je známo, že Alar a KIN mohou podporovat tvorbu chlorofylu a zpomalovat stárnutí (senescenci) rostlin, KIN navíc stimuluje tvorbu nových pupenů^{13,14}. Na médiu s Alarem se tvořil větší počet zelených listů (5–6), na médiu s KIN byl počet listů stejný jako u kontroly (3–4), ale listy byly mohutnější. Při převodu rostlin



Obr. 2. Srovnání průměrné hmotnosti podzemních částí maky a jakonu u rostlinných genotypů pěstovaných v letech 2001 (□) a 2002 (■) (hodnoceny hypocotylы rostlin vysetých v červnu 2002); a – hypocotylы maky (*L. meyenii*), b – kořenové hlízy jakonu (*S. sonchifolius*)

z média o nižší koncentraci KIN (0,1 μM , resp. 0,5 μM) na médium s jeho vyšší koncentrací (0,5 μM resp. 10 μM) došlo k probuzení úžlabních pupenů. Meristémy však byly malé, nedocházelo k jejich dalšímu růstu, a díky tomu se i obtížně extirpovaly (izolovaly). Pro stimulaci tvorby úžlabních pupenů byly testovány růstové regulátory 6-(benzylamino)purin (BAP), zeatin ((*E*)-2-methyl-4-(9*H*-purin-6-ylamino)but-2-en-1-ol, Z) a KIN v koncentračním rozmezí 0,2–1 μM . Při použití KIN se opakovale výše uvedený jev, podobné výsledky byly i na médiu s BAP. V obou případech byly získány maximálně tři prorůstající pupeny resp. meristémy na rostlinu, bez ohledu na použitou koncentraci. Na komerčním multiplikačním médiu A (Sigma) bylo dosaženo iniciace tvorby úžlabních pupenů v rozsahu 4–5 na rostlinu. Působení Z (0,8–1 μM) bylo efektivnější, celkem bylo dosaženo iniciace tvorby až 7 meristémů na rostlině. Nicméně i na tomto médiu došlo k předčasnému zastavení růstu a regenerace rostlin. K nejintenzivnějšímu prorůstání meristémů na epikotylu (a to i v případě kultivace samotného epikotylu bez kořenů a vrcholových listů) docházelo při kultivaci na médiu E podle Sheparda¹⁵, které obsahuje 0,5 mg.l^{-1} BAP a 0,1 mg.l^{-1} kyseliny giberelové (GA3). Na tomto médiu došlo k prodlužovacímu růstu, který byl zárukou snadné extirpace meristémů, případně mladých rostlinek o velikosti 7–8 mm. Z uvedeného vyplývá potřeba ověřit vyšší dávku BAP (1,5–2 μM) v kombinaci se standardním MS médiem (nejvyšší testovaná dávka BAP byla 1 μM tj. 0,387 mg.l^{-1} na rozdíl od 0,5 mg.l^{-1} BAP v médiu E podle Sheparda¹⁵). Extirpované meristémy byly kultivovány na MS médiu s přidavkem: a) indol-3-ylacetové kyseliny (IAA, 2,3 μM), b) 1-naftylacetové kyseliny (NAA, 0,1 μM) (cit.¹⁶), c) vitaminů podle Gamborga¹⁷ a přidavkem 0,1 μM GA3, 0,1 μM IAA a 0,1 μM KIN, d) 4-indol-3-ylbutanové kyseliny (IBA, 1 mg.l^{-1}), NAA (1 mg.l^{-1}) a 2,4-dichlorofenoxyacetové kyseliny (2,4-D, 0,1 mg.l^{-1}), e) bílkovinných extraktů z pšenice, sóji a sójové syrovátky v dávkách 50 ml.l^{-1} média a f) L-askorbové kyseliny (5 mg.l^{-1}), thiaminu (5 mg.l^{-1}) a CaCl_2 (44,1 mg.l^{-1}). Všechna testovaná média se ukázala jako nevyhovující, ani na jednom z nich nedošlo k úplné

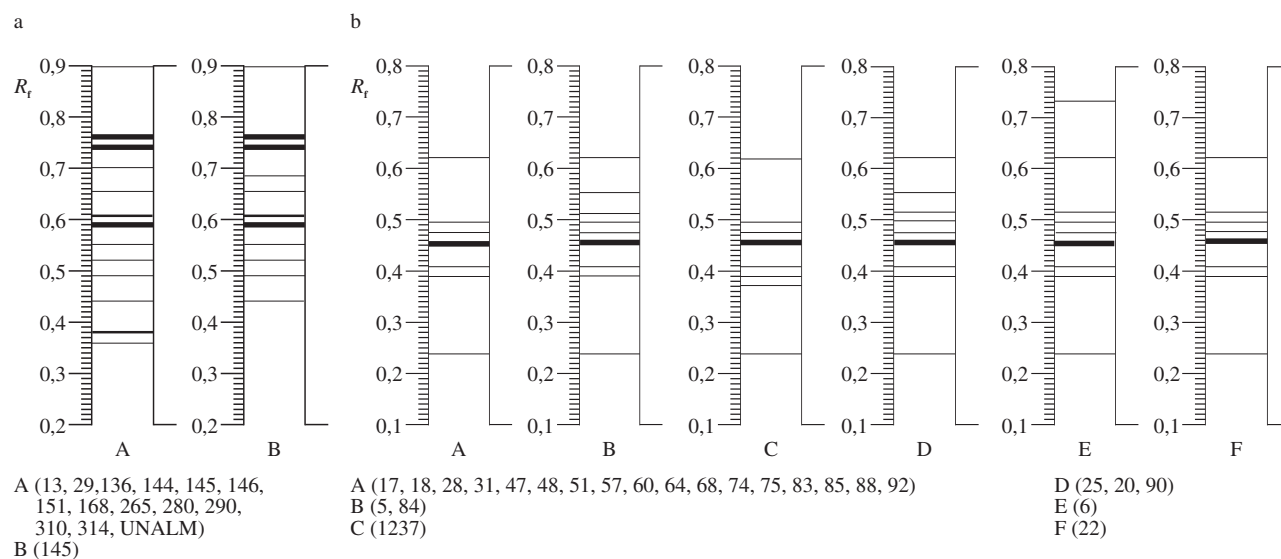
regeneraci rostlin. V současné době probíhá testování kultivace odebraných meristémů (mladých rostlinek) na plném MS médiu s přidavkem 0,02–0,1 μM NAA nebo 0,05–0,1 mg IAA.l^{-1} nebo na poloviční koncentraci MS média s přidavkem 1–5 μM NAA. V několika případech bylo pozorováno kořenění, a to při dávce 2 nebo 3 μM NAA a 0,05 mg.l^{-1} IAA.

Rostliny maky v podmínkách *in vitro* lze bez pasáže udržovat až 3 měsíce na MS médiu. Experimenty zaměřené na zjištění možnosti dlouhodobé kultivace maky *in vitro* ukázaly, že rostliny ponechané po dobu 10 měsíců na médiu bez pasáže (16 h fotoperioda, 21 °C) většinou zasychají. Pouze několik rostlin přežilo, přešlo do prodlužovacího růstu a vykvetlo. Při kultivaci v chladových podmínkách (10 °C a 8 h fotoperioda) nebyl pozorován zásadní vliv nízké teploty na prodloužení životnosti. U starších a opakovaně pasážovaných rostlin nastupovala rychleji senescence. Ukazuje se, že rostliny maky převedené z *in vitro* do *in vivo* podmínek jsou schopny dalšího růstu a vývoje.

4. Polymorfismus isoenzymů

Směsný vzorek pravých listů odebraných z přizemní růžice pěti mladých rostlin maky byl analyzován standardní metodou^{6,9,18} a PAGE gely byla specificky detegována aktivita 17 enzymů: alkoholdehydrogenasa (ADH), diaforasa (DIA), esterasa (EST), fosfoglukomutasa (PGM), glutamát-oxalacetáttransaminasa (GOT), glutamátdehydrogenasa (GDH), glukosofosfátisomerasa (GPI), glukosa-6-fosfátdehydrogenasa (GPD), kyselá fosfatasa (ACP), isocitrátdehydrogenasa (IDH), leucinaminopeptidasa (LAP), malátdehydrogenasa NAD^+ (MDH), malátdehydrogenasa NADP^+ (ME), NADH dehydrogenasa (NADH DH), superoxid dismutasa (SOD), šikimátdehydrogenasa (SHDH), 6-fosfoglukonátdehydrogenasa (PGD).

Ze 17 enzymů stanovených u genotypů maky jich bylo pět vyloučeno (ADH, MDH, PGM, GPI, PGD), protože jejich výsledky nebylo možné interpretovat z důvodu špatné de-



Obr. 3. Zymogramy isoenzymových spekter esteras; a – *L. meyenii*, b – *S. sonchifolius*

tekce. Ze zbývajících 12 enzymů pouze esterasa (EST; EC 3.1.1.1.) vykazala určitý, i když velmi nízký, stupeň polymorfismu, přičemž na jeho základě bylo možné genotypy maky rozdělit do dvou skupin (obr. 3a). V rámci celého souboru 12 enzymů bylo zaznamenáno 64 pruhů (isoforem). Zymogramy stanovených isoenzymových spekter EST jsou uvedeny na obr. 3a. I když byla u souboru genotypů *L. meyenii* zjištěna relativně velká variabilita v morfologických znacích hypokotylu i výnosových parametrech (tabulka I, obr. 1a, 2a), nelze ji dát zcela jednoznačně do souvislosti s dosud zjištěným polymorfismem isoenzymů (obr. 3a). Pouze genotyp 145 se svým spektrem odlišoval od všech ostatních. Srovnáme-li tuto odlišnost s hlavními znaky variability hypokotylu (tabulka I) je zřejmé, že v případě tvaru⁴ se tento genotyp odlišoval od ostatních pouze v prvním roce pěstování. Pokud jde o hodnocení tvaru ve druhém roce pokusu, můžeme tento genotyp zařadit do skupiny nejčastěji se vyskytujících morfotypů. Od ostatních genotypů se tvarem odlišovaly genotypy 314 a 168. Zajímavé je, že předchozí předběžné analýzy⁸ diferencovaly stejný soubor genotypů na základě polymorfismu EST na tři skupiny (A, B, C), přičemž součástí skupiny B byly genotypy 145, 146, 151, 280 a 310, naopak Unalm amarilla byl pouze jediným zástupcem skupiny C. Jiné spektrum zymogramů stanovené v této analýze je však podmíněno použitím odlišného metodického přístupu. Ukazuje se tedy, v souladu s řadou předchozích studií realizovaných u různých rostlinných druhů^{19,20}, že polymorfismus zjištěný na bázi proteinů může být velmi variabilní, nemusí vykazovat stejné výsledky, a to v závislosti na celé řadě faktorů⁶.

U souboru 25 genotypů *S. sonchifolius* byla stanovována přítomnost 16 enzymů (ADH, DIA, EST, PGM, GOT, GDH, GPI, IDH, ACP, LAP, MDH, ME, NADH DH, SOD, SHDH, PGD). Tři z nich (ADH, MDH, PGM) byly vyloučeny z analýz z důvodu špatné vizualizace. Ze zbývajících enzymů bylo 11 homonomních. U 13 sledovaných enzymů bylo celkem zaznamenáno 55 pruhů (isoforem). Pouze kyselá fosfatasa (ACP; EC 3.1.3.2.) a esterasa (EST; EC 3.1.1.1.) však vykazaly u testovaných genotypů polymorfismus. Zymogramy stanovených isoenzymových spekter EST jsou na obr. 3b. Jak je zřejmé z části hodnotící variability kořenových hlíz souboru 25 genotypů *S. sonchifolius* (tabulka I, obr. 1b, 2b), lze na jejím základě diferencovat několik hlavních skupin, a to zejména z hlediska tvaru². Tato variabilita však velmi málo koresponduje se zjištěným polymorfismem EST, na jehož základě byl studovaný soubor rozdělen do šesti skupin (obr. 3b). Nejrozsaáhlejší je skupina A, kterou reprezentuje cca 70 % všech studovaných genotypů. V této skupině je však zahrnuta většina morfotypů zjištěných v rámci dosud realizovaných pokusů (tabulka I). Ostatní isoformy reprezentují pouze 1–3 genotypy (obr. 3b). Odlišnosti zymogramů jednotlivých skupin jsou velmi malé a mají proto patrně relativně malou vypovídací schopnost o variabilitě v komplexním pojetí. Obdobné závěry lze učinit i o polymorfismu ACP, i když můžeme říci (tabulka I), že genotypy jakonu zahrnuté do skupiny B tvoří společnou skupinu morfotypů vykazující tvar 5. Tento fakt však platí pouze pro druhý rok pěstování. Současné výsledky o variabilitě EST relativně dobře korespondují s našimi dřívějšími poznatky^{6–9}, kdy byl stejný soubor genotypů rozdělen na základě polymorfismu EST do čtyř skupin.

Dosavadní výsledky studia polymorfismu enzymových markerů u maky a jakonu jednoznačně ukázaly, že variabilita

na této úrovni je v obou případech relativně velmi malá na rozdíl od široké variability v morfologických znacích. Další výzkum by měl zodpovědět otázky týkající se variability proteinů na úrovni jednotlivých rostlin, vlivu faktorů prostředí na homogenitu a stabilitu znaků u jednotlivých genotypů obou plodin, stejně jako na problém výběru nejvhodnějšího genotypu pro komerční pěstování, a to i v souvislosti s obsahem některých nutričně významných látek u obou studovaných druhů.

5. Analýza obsahových látek a jejich účinky

Pro srovnání obsahových látek v mace byl jako standard pro analýzu použit komerčně vyráběný dehydratovaný práškový produkt Maca andina naturala (QUIMICA SUIZA) pocházející z Peru. Pro vlastní analýzu obsahových látek byl připraven směsný vzorek hypokotylů maky pěstované v jednotlivých letech (2000–2002), které byly usušeny a rozemlety. Výsledky analýzy základních nutričních složek, minerálů a kontaminujících složek stanovených v potravinách v jednotlivých letech ve srovnání s komerčně dodávanou surovinou jsou shrnuty v tabulce II.

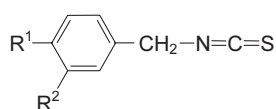
O složení a biologické aktivitě látek v hypokotylu *L. meyenii* bylo do roku 2000 málo informací³. Bylo známo složení steroidní frakce, obsahující 9,1 % brassikasterolu, 13,6 % ergosterolu, 27,3 % kampesterolu, 4,5 % ergostadienolu, 45,5 % sitosterolu²¹ a popsány struktury dvou isothiokyanátů, benzylisothiokyanátu *I* a 4-methoxybenzylisothiokyanátu *II* (cit.²²). Tyto látky vznikají v rostlinách hydrolýzou glukosinolátů enzymem myrosinase a byla u nich popsána protinádorová aktivita²². V nedávné době byl analyzován obsah a složení glukosinolátů v semenech, rašicích a dospělých rostlinách a v komerčních produktech maky²³. Ve všech testovaných vzorcích byly v různém poměru nalezeny benzylglukosinolát *III* (glukotropeolin), (4-methoxybenzyl)glukosinolát *IV*, 5-methyl-sulfinylpentylglukosinolát *V* (glukoalysin), 4-hydroxybenzylglukosinolát *VI*, (pent-4-en-1-yl)glukosinolát *VII* (glukobrassicin), (indol-3-ylmethyl)glukosinolát *VIII* (glukobrassicin) a (4-methoxyindol-3-ylmethyl)glukosinolát *IX*. Hypokotylu a nať maky mají díky těmto látkám velmi nepříjemnou vůni. V methanickém extraktu z hypokotylů maky byly nalezeny glukosinoláty (glukotropeolin *III* a 3-methoxyglukotropeolin *X*), isothiokyanáty (benzylisothiokyanát *I* a 3-methoxybenzylisothiokyanát *XI*) a další látky (uridin, kyseliny jablečná, benzoyljablečná, (1*R*,3*S*)-1-methyl-1,2,3,4,4a,8a-hexahydro-9*H*- β -karbolin-3-karboxylová kyselina *XII*; obr. 4) (cit.²⁴), benzylovaný derivát 1-hydroxy-1,2-dihydropyridinu, nazývaný makaridin *XIII*, benzylované amidy (makamidy), (*E,E*)-*N*-benzyl-5-oxooktadeka-6,8-dienamid *XIV*, *N*-benzylhexadekanamid *XV* a acyklický makaen – kyselina (*E,E*)-5-oxooktadeka-6,8-dienová *XVI* (cit.²⁵) (obr. 5). Látky *XIII*–*XVI* spolu s kyselinami linolenovou a linolovou jsou používány k charakterizaci a standardizaci komerčních přípravků obsahujících maku²⁶. Metodou GC/MS byl analyzován esenciální olej z nadzemní části maky a bylo identifikováno celkem 53 komponent²⁷. Nejvíce jsou v něm zastoupeny fenylacetonitril (85,9 %), benzaldehyd (3,1 %), (3-methoxyfenyl)acetonitril (2,1 %) a benzylisothiokyanát (0,6 %).

V literatuře se v posledních dvou letech objevila řada prací popisujících účinky maky na parametry sexuálního výkonu

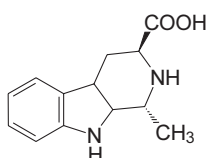
Tabulka II

Základní nutriční složky (%) a vybrané minerální a kontaminující látky (mg.kg⁻¹) v sušené mace a jakonu

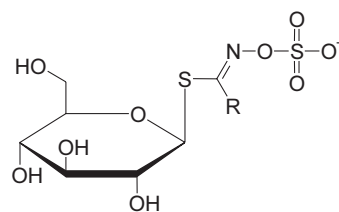
Složky	Maka			Andina	Jakon		Lit. ⁴	Metoda
	2000	2001	2002		2001	2002		
Základní nutriční složky a minerály								
Dusík	6,55	7,63	4,08	1,86	0,73	0,62	–	Kjeldahl
Bílkoviny	40,9	47,7	25,5	11,6	4,6	3,8	6,7	N x 6,25
Sacharidy	9,82	3,25	7,21	25,0	35,2	27,3	58,2	HPLC
Glukosa	2,86	0,92	0,63	1,6	8,98	4,58	35,0	
Fruktosa	0,67	0,35	0,18	0	22,9	16,3	15,8	
Sacharosa	6,29	1,98	6,40	23,4	3,30	6,40	7,4	
Oligosacharidy (jako sacharosa)	0,44	1,24	0,17	4,56	12,0	41,4	22,2	HPLC
Tuky	1,67	1,48	1,66	1,09	0,30	0,56	1,0	Soxhlet
Hrubá vláknina	17,7	15,1	–	9,1	7,1	9,5	5,7	Scharrer
Energetická hodnota, kJ na 100 g	924	921	617	663	687	550	–	Vyhláška 293/1997 Sb.
Draslík	12 980	14 730	16 220	16 200	19 400	14 980	23 200	AAS
Sodík	610	1050	670	260	140	120	119	AAS
Kontaminanty stanovené v potravinách								
Arzen	0,61	0,58	0,15	0,59	0,04	0,17	3 ^a	ICP-MS
Kadmium	0,18	0,15	0,15	0,56	0,25	0,03	0,5 ^a	ICP-MS
Olovo	0,92	1,43	0,48	2,47	0,04	0,05	8 ^a	ICP-MS
Měď	8,0	10,3	7,0	5,14	4,5	4,6	80 ^a	ICP-MS
Nikl	1,9	2,7	1,1	0,49	1,5	0,56	6 ^a	ICP-MS
Zinek	61,8	67,5	40,9	58,4	8,5	7,6	80 ^a	ICP-MS
Železo	385	865	223	72,3	11	23	80 ^a	ICP-MS
Dusičnany	2860	7080	2870	<100	1720	100	2000 ^a	kapilární isotachoforéza

^a Přípustné množství dle vyhlášky 298/1997 Sb.

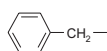
	R ¹	R ²
I	H	H
II	CH ₃ O	H
XI	H	H



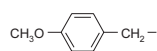
XII



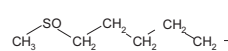
R =



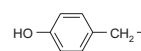
III



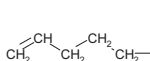
IV



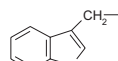
V



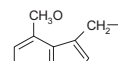
VI



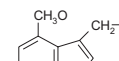
VII



VIII

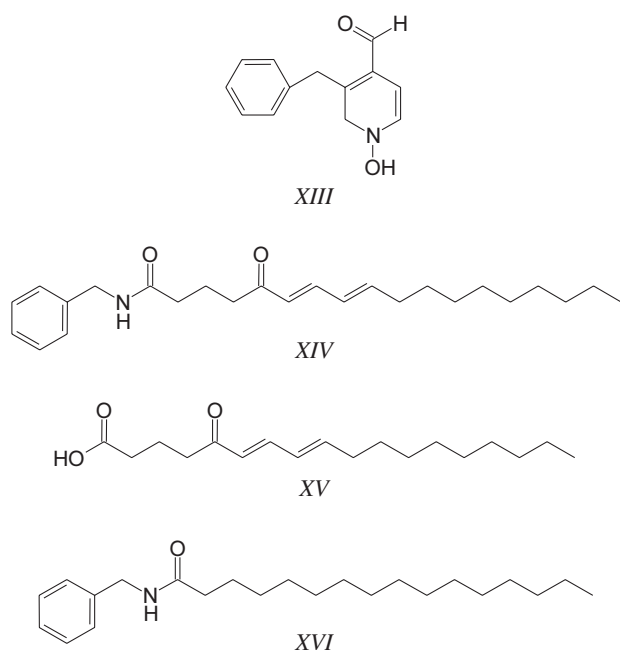


IX

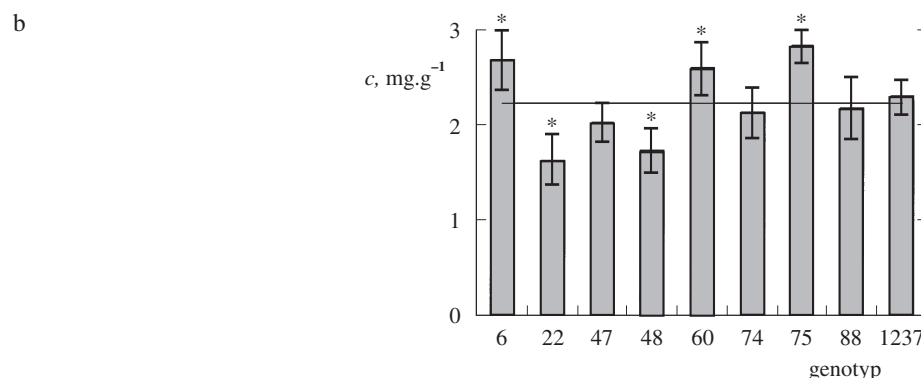
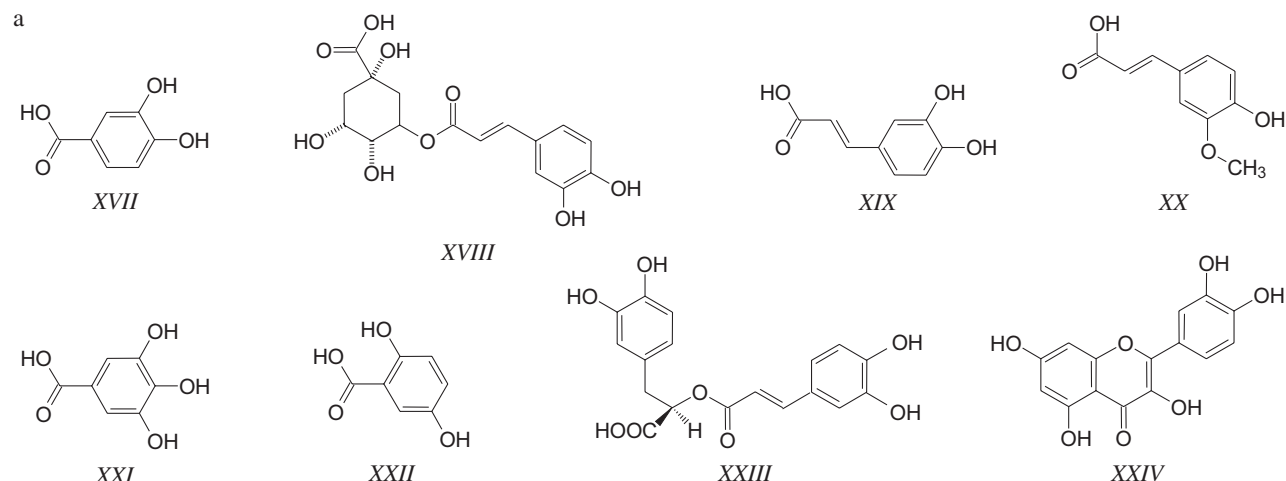


X

Obr. 4. Benzyliothioyanáty, glukosinoláty a (1R,3S)-1-methyl-1,2,3,4,4a,8a-hexahydro-9H-β-karbolin-3-karboxylová kyselina XII



Obr. 5. Makaridin, makaeny a makamidy

Obr. 6. Fenolové sloučeniny identifikované v listech jakonu a celkový obsah fenolových látek; a – struktury, b – celkový obsah fenolových látek (mg.g⁻¹ suché drogy) v genotypech jakonu pěstovaných v Olomouci–Holici (* $P < 0,01$)

u zvířat, zejména potkanů a myši^{28–31} a na kvalitu spermatu u lidských dobrovolníků³². Žádná z citovaných prací však neuvádí mechanismus účinku tohoto tradičního andského afrodisiaka a adaptogenu.

Informace o obsahových látkách v nadzemních částech jakonu, na rozdíl od jeho hlíz a maky, dosud v literatuře chybí, a proto jim byla věnována naše pozornost. Směsný vzorek listů jakonu byl sušen za pokojové teploty do konstantní hmotnosti. Byly připraveny extrakty z listů za použití několika extrakčních procedur a jako nejvhodnější byla vybrána extrakce methanolem v Soxhletově extraktoru, přičemž výsledný extrakt byl zahuštěn, dispergován ve vodě a odmaštěn extrakcí v petroletheru. Vodná vrstva byla posléze okyslena 0,1 M-H₂SO₄ a extrahována ethyl-acetátem. Výsledný ethyl-acetátový extrakt (celkový výtěžek po odpaření rozpouštědla cca 13 mg.g⁻¹ suché drogy) byl použit pro vlastní analýzu. V extraktu byly identifikovány a kvantifikovány kyseliny protocatechové XVII, chlorogenová XVIII, kávová XIX, ferulová XX, galová XXI, gentisová XXII a ve formě glykosidu kyselina rozmarýnová XXIII; dále pak kvercetin XXIV, včetně jeho glykosidu a další čtyři neidentifikované komponenty^{33–35} (obr. 6a). Deriváty kyseliny kávové a její estery kyseliny oktulosoové³⁷ byly nedávno nalezeny také v hlízách jakonu³⁵. Fenolovým látkám prokázaným analýzou připisujeme pozorované antioxidační a cytoprotektivní účinky extraktů z listů jakonu^{33,38}.

V listech vybraných jednotlivých genotypů jakonu (sběr červenec 2002) byl analyzován celkový obsah fenolových látek. Suchá droga byla zpracována dle výše popsaného postupu a v extraktu byly tyto látky stanoveny Folino-Ciocalteauovým činidlem³⁹. Výsledky stanovení, přepočítané na výchozí suchou drogu (obr. 6b), umožnily rozdělení analyzovaných klonů do tří skupin: a) hodnoty signifikantně vyšší než průměr (genotypy 6, 60 a 75), b) průměrné hodnoty (genotypy 47, 74, 88, 1237) a c) signifikantně podprůměrné hodnoty (genotypy 22 a 48). Zjištěné rozdíly v zastoupení fytochemicky významných látek však přímo nekorelovaly s polymorfismem isoenzymů ani morfotypů jakonu.

6. Technologie zpracování hlíz jakonu

Z hlediska dalšího zpracování se největším problémem stala nízká trvanlivost hlíz, které jsou velmi křehké, při sklizni se snadno poškodí, polámou, případně dochází k odřetí jejich tenké slupky. V místech poškození může snadno a rychle dojít k napadení plísněmi a projevům hniloby. Rovněž i v mechanicky nepoškozených hlízách dochází poměrně brzy k nežádoucím procesům. Hlízy ztrácejí vodu, stávají se gumovitými, postrádají typickou křupavost a dochází k podstatným změnám ve složení sacharidů⁴⁰, což je důležité z hlediska jejich uplatnění jako potraviny pro diabetiky. Zdraví prospěšné, ale nestrávitelné β -oligofruktany hydrolyzují na glukosu a fruktosu, čímž upotřebení hlíz pro diabetiky klesá. Z těchto důvodů jsme se snažili vypracovat technologický postup zpracování hlíz jakonu do trvanlivé formy vhodné pro další použití. Hlavním cílem byla snaha zachovat vysoký obsah vody v hlízách jakonu a pokusit se o jeho zpracování na dřevě několika technologickými postupy. Rozváření používané při výrobě jablečné dřeně se neosvědčilo z důvodu špatné rozvářivosti hlíz. Navíc se při tomto postupu vyluhovalo velké množství sacharidů do varné tekutiny a výsledný produkt byl zcela nevhodný ze senzorického hlediska. Nezdarem skončil také pokus o zpracování hlíz v lince na výrobu špenátového protlaku. Při mletí dochází k oxidaci fenolových látek, a tím ke změně barvy suroviny z krémově bílé na nepříjemně hnědozelenou až hnědou. Mikrobiologická analýza takto zpracované suroviny navíc prokázala vysoký obsah koliformních bakterií. Vzhledem k těmto skutečnostem byl tento postup zpracování shledán rovněž jako nevyhovující. V laboratorním měřítku bylo dosaženo uspokojivého výsledku sušením pokrájených oloupaných hlíz podobně jako při domácí výrobě sušených jablek, a proto byl pro další zpracování zvolen tento způsob. Technologický postup byl následující: předmáčení hlíz, praní v pračce, parní loupání, praní v kartáčové pračce, kostkování, sprchování, předsušení (cca 12 min, 115 °C), sušení ve třech krocích (30 min při 107 °C, 95 min při 100 °C a 100 min při 75 °C). Výsledkem tohoto postupu byly lupínky o velikosti 2–3 mm. Poměr suchých lupínek k původní surovině je 1:9–1:8,5 a závisí zejména na původní velikosti hlíz vzhledem k odpadu při loupání. Lupínky jsou ve výsledné formě stabilní již téměř dva roky, jsou příjemně křupavé s nasládlou chutí. Také při tomto zpracování dochází k částečné změně barvy suroviny, ve formě lupínek však nepůsobí natolik nepříznivě. Lupínky byly použity pro analýzu základních nutričních složek, vybraných minerálů a kontaminantů (tabulka II) a pro analýzu složení cukrů⁴¹.

7. Závěr

Z dosavadních poznatků je zřejmé, že jakon lze v našich podmínkách pěstovat bez větších problémů. Analýzou hlíz jakonu pěstovaného v České republice bylo zjištěno, že složení jeho obsahových látek se podstatně neliší od údajů nalezených v literatuře. Rozdíly zjištěné v zastoupení jednotlivých sacharidů byly nejspíše ovlivněny způsobem skladování a zpracování, neboť přítomné β -polyfruktany podléhají po sklizni hydrolytickým změnám.

V případě pěstování maky jsou výsledky méně příznivé. V opakovaných polních pokusech byly dosaženy jen relativně nízké výnosy, spojené s tvorbou drobných hypokotylů. Rovněž se ukazuje, že výnosy mohou významně kolísat mezi jednotlivými ročníky pěstování. V chemickém složení hypokotylů byly zjištěny významné rozdíly. Ve srovnání s komerčním vzorkem byl opakovaně zjištěn vyšší obsah bílkovin a nižší obsah sacharidů. Za negativní poznatek lze považovat vysokou kumulaci dusičnanů v hypokotylech, výraznou zejména ve sklizni z roku 2001, kdy maka byla pěstována na čerstvě vyhnojeném pozemku.

Z dosud získaných výsledků vyplynulo, že studované genotypy maky a jakonu vykazují značnou morfologickou, výnosovou i chemickou variabilitu, přičemž však u nich nebyla prokázána přímá závislost mezi jednotlivými sledovanými znaky. Hlubší poznání těchto souvislostí by mělo být předmětem dalšího výzkumu. V budoucnu se rovněž hodláme zaměřit zejména na studium variability obsahu jednotlivých sacharidů v hlízách různých genotypů jakonu ve vztahu k jejich morfologické variabilitě. Cílem takto zaměřeného výzkumu bude výběr vhodných genotypů z hlediska technologického zpracování (vliv tvaru hlíz) a jejich využití v potravních doplncích a funkčních potravinách. U listů jakonu plánujeme dokončení identifikace obsahových látek, srovnání obsahu celkových fenolových látek v jednotlivých vývojových stádiích rostlin a pokračování testů biologické aktivity *in vitro* a *in vivo*.

Autoři děkují paní D. Vondrákové, I. Tiefenbachové a panu V. Všetickovi za vynikající technickou spolupráci a Ing. Janu Frčkovi, CSc. za poskytnutí rostlinného materiálu a technologie pěstování. Výzkum je podporován projektem GA ČR (grant č. 303/01/0171).

LITERATURA

- Frček J., Michl J., Pavlas J., Šupichová J., v knize: *Plant Genetic Resources* (Annual report 1995), str. 73. University of Agriculture in Nitra, Nitra 1995.
- Frček J.: nepublikované výsledky.
- Valentová K., Frček J., Ulrichová J.: Chem. Listy 95, 594 (2001).
- Quirós C. F., Cárdenas R. A., v knize: *Andean Roots and Tubers Ahipa, Arracacha, Maca and Yacon* (Hermann M., Heller J., ed.), str. 173. International Plant Genetic Resources Institute, Rome 1997.
- Tyukavin G. B.: Selskoc. Biol. 3, 81 (2002).
- Lebeda A., Doležalová I., Dziedziarková M., Doležal K., Frček J.: *Využití molekulárních markerů v biologii, šlechtění a uchovávání genových zdrojů rostlin, Šumperk, 4.–6. listopad 2002*, str. 84.
- Lebeda A., Doležalová I., Doležal K.: *XXVIth Internatio-*

- nal Horticultural Congress and Exhibition (IHC2002), Toronto 11.–17. srpna 2002, Abstracts, str. 199.*
8. Lebeda A., Doležalová I., Doležal K.: *Acta Hort.*, v tisku.
 9. Lebeda A., Doležalová I., Dziechciarková M., Doležal K., Frček J.: *Czech J. Genet. Plant Breed.* 439, 1 (2003).
 10. Echegeray M. P., v knize: *Resúmenes de Curso Taller Internacional sobre Maca „Cultivo, aprovechamiento y conservación“* (Palomino M. E., ed.). Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), Lima 1999.
 11. IBPGR: *Descriptors for Brassica and Raphanus*. International Board for Plant Genetic Resources, Rome 1990.
 12. Murashige T., Skoog F.: *Physiol. Plant.* 15, 473 (1962).
 13. Kutina J.: *Regulátory růstu a jejich využití v zemědělství a zahradnictví*. SZN, Praha 1988.
 14. Procházka S., Šebánek J.: *Regulátory rostlinného růstu*. Academia, Praha 1997.
 15. Shepard J. F., Toten R. E.: *Plant Physiol.* 60, 313 (1977).
 16. Votruba et al.: *Explantátové techniky*, skripta VŠZ Praha, Praha 1987.
 17. Gamborg O. L., Miller R. A., Ojima K.: *Exp. Cell Res.* 50, 151 (1968).
 18. Vallejos C. E., v knize: *Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part A* (Tanksley D. S., Orton T. J., ed.), str. 469. Elsevier, New York 1983.
 19. Soltis D. E., Soltis P. S.: *Isozymes in Plant Biology*. Dioscorides Press, Portland 1989.
 20. Manchenko G. P.: *Handbook of Detection of Enzymes on Electrophoretic Gels*. CRC Press, London 1994.
 21. Dini A., Migliuolo G., Rastrelli L., Saturnino P., Schettino O.: *Food Chem.* 49, 347 (1994).
 22. Johns T.: *J. Ethnobiol.* 1, 208 (1981).
 23. Li G., Ammermann U., Quirós C. F.: *Econ. Bot.* 55, 255 (2001).
 24. Piacente S., Carbone V., Plaza A., Zampelli A., Pizza C.: *J. Agric. Food Chem.* 50, 5621 (2002).
 25. Muhammad I., Zhao J., Dunbar D. C., Khan I. A.: *Phytochemistry* 59, 105 (2002).
 26. Ganzera M., Zhao J., Muhammad I., Khan I. A.: *Chem. Pharm. Bull.* 50, 988 (2002).
 27. Tellez M. R., Khan I. A., Kobaisy M., Schrader K. K., Dayan F. E., Osbrink W.: *Phytochemistry* 61, 149 (2002).
 28. Cicero A. F. G., Bandieri E., Arletti R.: *J. Ethnopharmacol.* 75, 225 (2001).
 29. Cicero A. F. G., Piacente S., Plaza A., Sala E., Arletti R., Pizza C.: *Andrologia* 34, 177 (2002).
 30. Gonzales G. F., Ruiz A., Gonzales C., Villegas L., Cordova A.: *Asian J. Androl.* 3, 231 (2001).
 31. Zheng B. L., He K., Kim C. H., Rogers L., Shao Y., Huang Z. Y., Qien L. C., Zheng Q. Y.: *Urology* 55, 598 (2000).
 32. Gonzales G. F., Cordova A., Gonzales C., Chung A., Vega K.: *Asian J. Androl.* 3, 301 (2001).
 33. Valentová K., Cvak L., Muck A., Ulrichová J., Šimánek V.: *Eur. J. Nutr.* 42, 61 (2003).
 34. Jirovský D., Horáková D., Kotouček M., Valentová K., Ulrichová J.: *J. Sep. Sci.* 26, 739 (2003).
 35. Muck A., Valentová K., Kohoutová J., Harmatha J., Ulrichová J., Šimánek V.: nepublikované výsledky.
 36. Takenaka M., Yan X., Ono H., Mitsuru Y., Nagata T., Nakanishi T.: *J. Agric. Food Chem.* 51, 793 (2003).
 37. Takenaka M., Ono H.: *Tetrahedron Lett.* 44, 999 (2003).
 38. Valentová K., Ulrichová J.: nepublikované výsledky.
 39. Singleton V. L., Rossi J. A.: *Am. J. Enol. Vitic.* 16, 416 (1965).
 40. Goto K., Fukai K., Hikida J., Nanjo F., Hara Y.: *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 59, 2346 (1995).
 41. Valentová K., Přikrylová V., Křen V., Halada P., Ulrichová J., Šimánek V.: *Chem. Listy* 96, 496 (2002).

A. Lebeda^a, I. Doležalová^a, K. Valentová^b, M. Dziechciarková^a, M. Greplová^c, H. Opatová^d, and J. Ulrichová^c
^{(^aDepartment of Botany, Faculty of Science, Palacký University, Olomouc, ^bInstitute of Medical Chemistry and Biochemistry, Faculty of Medicine, Palacký University, Olomouc, ^cPotato Research Institute Ltd., Havlíčkův Brod, ^dDepartment of Food Preservation and Meat Technology, Institute of Chemical Technology, Prague): **Biological and Chemical Variability of Maca and Yacon**}

A set of 15 maca and 25 yacon genotypes cultivated under field conditions were assessed as to relationships between morphotypes of underground organs, yield parameters, and polymorphism of isozymes. *In vitro* cultivation and the content of some chemical compounds were also studied. Underground organs of both crops showed a wide variety strongly dependent on environmental factors. The results showed that maca forms small-weight hypocotyls. Differences in chemical composition compared with a commercial source were observed. The highest production (3.8 kg/plant) of yacon tubers was observed in four genotypes. Drying of yacon chips was found to be a good method of preservation. Of 17 analysed enzymatic systems, only esterases showed some degree of polymorphism in both crops, dividing genotypes of maca into two and yacon into six groups. Polymorphism of esterases does not correspond with morphological characters of underground organs of both crops or with total phenolic contents in different genotypes of yacon leaves. Screening of cultivation media demonstrated that concentration of regulators must be optimised to be suitable for *in vitro* cultivation of maca. The results showed that yacon can be successfully cultivated in Europe in contrast to maca.

STEROIDY NA ZAČÁTKU JEDENADVACÁTÉHO STOLETÍ*

ALEXANDER KASAL

Ústav organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6
e-mail: kasal@uochb.cas.cz

Došlo 2.4.02, přepracováno 30.12.02, přijato 15.5.03.

Klíčová slova: steroidy, přírodní látky, parciální syntéza, biologická aktivita, enantiomery

Obsah

1. Úvod
2. Nomenklatura a způsob zobrazování struktur
3. Steroidy jako součást oboru přírodních látek
4. Steroidní evergreeny (estrogeny, „DHEA“, feromony)
5. Syntéza přírodních látek steroidní řady (skvalamin, 2-methoxyestradiol, cefalostatin a ritterostatin)
6. Syntéza analogů biologicky aktivních steroidů (cíle: separace aktivit, zvýšení biologické aktivity, potřeba většího množství látky)
7. Syntéza sloučenin obsahujících steroidní molekulu jako stavební blok
8. Závěr

1. Úvod

Tento kurz není určen specialistům v oboru steroidní chemie, ale lidem, kteří mohou na steroidní problematiku narazit zcela náhodně. Takový přístup ke steroidům je poměrně pravděpodobný, když si uvědomíte, kolika třeba fyzikálních oborů se steroidy týkají. Vždyť u nukleární magnetické rezonance (NMR) a hmotové spektroskopie (MS) byly obecně platné zákonitosti poznávány právě na steroidech, které poskytovaly vhodné rigidní modely. Totéž platí o chirálních metodách, optické rotační disperzi (ORD) a cirkulárním dichroismu (CD). A kolika oborů lékařství se steroidy týkají, když mezi nimi nacházíme endogenní látky s aktivitou mužských a ženských pohlavních hormonů, hormonů kůry nadledvinek, vitaminů, důležitých složek buněčných membrán či trávicího systému. A kolik exogenních steroidů, ať už přírodních (kardenolidy, bufadienolidy, alkaloidy) či syntetických (anabolika, abortiva) na zdraví moderního člověka v současné době působí.

Tento postgraduální kurz probíhá na tomto ústavu téměř čtvrt století a přednášku o steroidech tu pronesl Dr. Václav Černý přesně před 20 lety¹. Měl bych navázat tam, kde on skončil, ale protože vím, že laik si dnes chybějící informace nachází především na internetu, začnu shrnutím současně používané nomenklatury, aby se posluchač byl schopen s in-

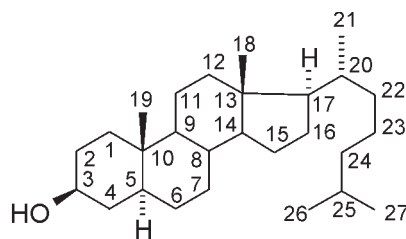
ternetem domluvit. Nomenklatura podle Chemical Abstracts není v současné literatuře používána beze zbytku, proto ji doplním nomenklaturou starou, která přežívá díky pracovníkům příbuzných oborů, jako je medicína a biologie.

2. Nomenklatura a způsob zobrazení struktur

Nejprve způsob grafického znázornění: číslování jednotlivých poloh je ukázáno na vzorci 5 α -cholestan-3 β -olu (obr. 1). Číslování začíná od šestičlenného kruhu vlevo a pokračuje po obvodu. Je-li připojení substituentů ke skeletu vyznačeno plným klínem, směřují tyto substituenty nad rovinu steroidního jádra a v názvu jsou označeny jako β -substituenty, vazba substituentů pod rovinou jádra (tedy s α -konfigurací) je značena šrafovaně. Většina steroidů je odvozována od těchto několika základních steroidních uhlovodíků (tabulka I).

Substituce v postranním řetězci bývala vyjadřována podle Fischerovy-Plattnerovy notace, v níž byla molekula v uvažovaném místě nazírána tak, jakoby nejdelší řetězec byl natažen vzhůru a prohnut dolů jako luk: na dolním konci zůstával steroidní skelet, na horním konci byl vzdálenější uhlík sousedící s uvažovaným centrem chiralidy. V této konformaci řetězce byly substituenty vpravo (a vlastně nahoru) definovány jako α -substituenty, substituenty mířící vlevo (také nahoru) jako β -substituenty. Např. cholestanový postranní řetězec byl znázorňován vzorcem A (obr. 2). Mnohem méně místa v tisku zabere cik-cak struktura B, která je také bližší nejpravděpodobnějšímu konformeru tohoto postranního řetězce. Tehdy se β -substituenty značily plnou vazbou. V současnosti ale používáme projekční vzorce zřetelně vyznačující stereochemii, a tak se tato 20R-methylová skupina kreslí čárkovaně (tedy v přehledu uhlovodíků vzorec C). Ale díky tomuto historicky danému dvojímu přístupu (definovaná notace vs. projekční vzorec) se v literatuře vyskytují oba vzorce cholesterolu a jeho derivátů přibližně stejně často, protože autoři většinou staré struktury opisovali ze starých monografií, aniž uvádějí pojmový rámec těchto struktur.

U molekuly, v níž je dalších 8 asymetrických uhlíků, se ujal zvyk vyjadřovat konfiguraci na těchto uhlících jen tehdy, je-li jiná než tzv. přirozená. Mlčky se tedy předpokládá, že každý ví, že β -konfiguraci zaujímá „normálně“ jen vodík H-8,



Obr. 1. Strukturální vzorec 5 α -cholestan-3 β -olu, číslování skeletu

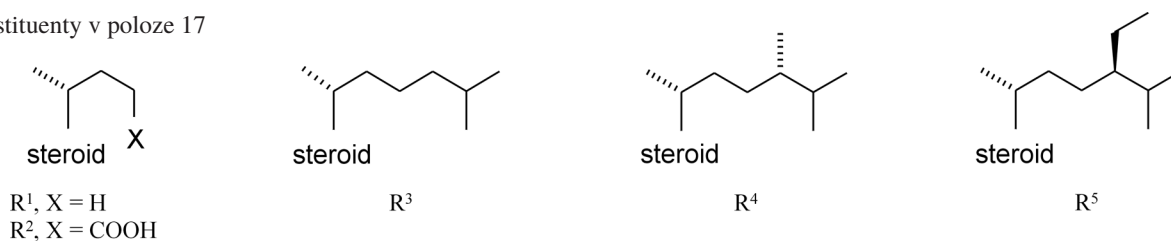
* Předneseno na postgraduálním kurzu *Chemie a biochemie přírodních látek*, který pořádal ÚOCHB AV ČR v roce 2002.

Tabulka I

Skelety tvořící názvoslovný základ tetracyklických steroidů

	Substituenty v polohách			Název uhlovodíku (starší název v závorce)
	19	18	17	
	H	H	–	5 α - či 5 β -gonan
	H	methyl	–	5 α - či 5 β -estran (5 α - či 5 β -oestran)
	methyl	methyl	–	5 α - či 5 β -androstan (androstan či testan)
	methyl	methyl	ethyl	5 α - či 5 β -pregnan (allopregnan či pregnan)
	methyl	methyl	R ¹	5 α - či 5 β -cholan (allocholan či cholan)
	methyl	methyl	R ²	5 α - či 5 β -cholanová kyselina (allocholanová či cholanová kyselina)
	methyl	methyl	R ³	5 α - či 5 β -cholestan (cholestan či koprostan)
	methyl	methyl	R ⁴	5 α - či 5 β -ergostan
	methyl	methyl	R ⁵	5 α - či 5 β -stigmasteran

Substituenty v poloze 17

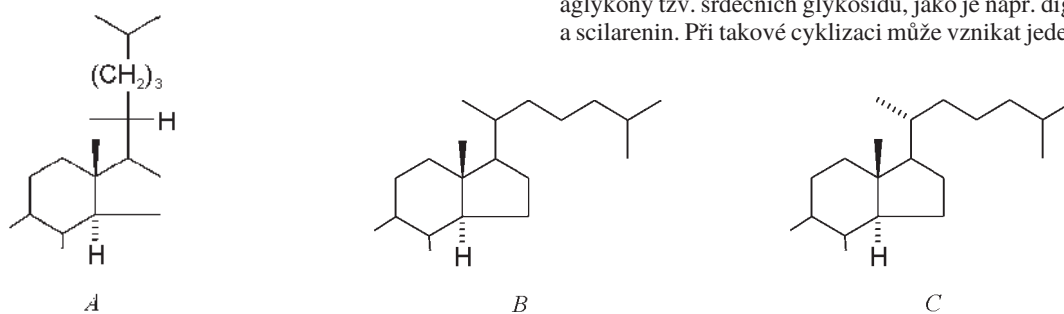


angulární methylové skupiny a eventuelně i uhlíkatý substituent v poloze 17. Tzv. normální je α -konfigurace u H-9 a H-17. Většina přírodních steroidů má *trans* anelaci kruhů C a D, tedy v poloze 14 je vodík v poloze α , ale v případě srdečních glykosidů a bufadienolidů se vyskytuje u kruhů C a D *cis* anelace, tedy C14-konfigurace je obrácená (14 β -H).

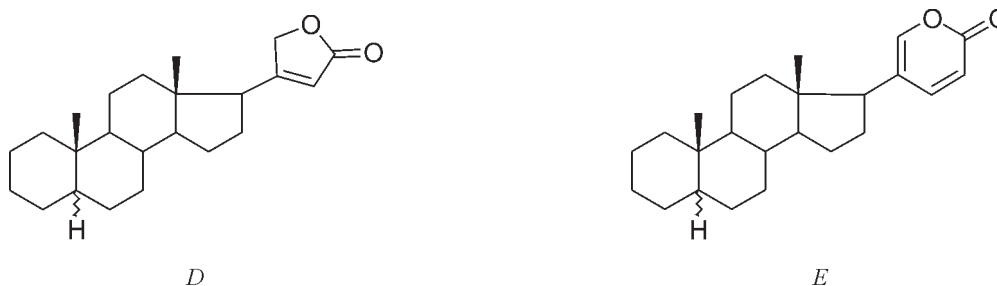
Látky s 5 α i 5 β -konfigurací se v přírodě vyskytují s přibližně stejnou četností, a nedá se tedy u polohy 5 obecně

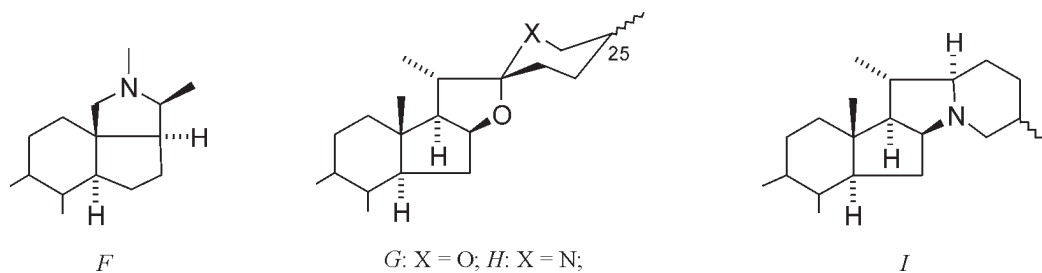
mluvit o „přirozené“ konfiguraci. Proto konfiguraci v této poloze je vždy třeba explicitně vyznačit. Zase se stává, že tento požadavek není vždy splněn, nejčastěji na to zapomínají autoři, kteří netuší, že může existovat i diastereomer jejich produktu. Týká-li se určitý výrok obou diastereomerů, kreslíme vazbu vlnitou a používáme další řecké písmeno ξ .

Postranní řetězec steroidu může být i substituován heterocyklem a cyklizován. 5 ξ -Kard-20(22)-enolid (D, obr. 3) a 5 ξ -bufa-20,22-dienolid (E) jsou nomenklaturním základem pro aglykony tzv. srdečních glykosidů, jako je např. digitoxigenin a scilarenin. Při takové cyklizaci může vznikat jeden nebo dva

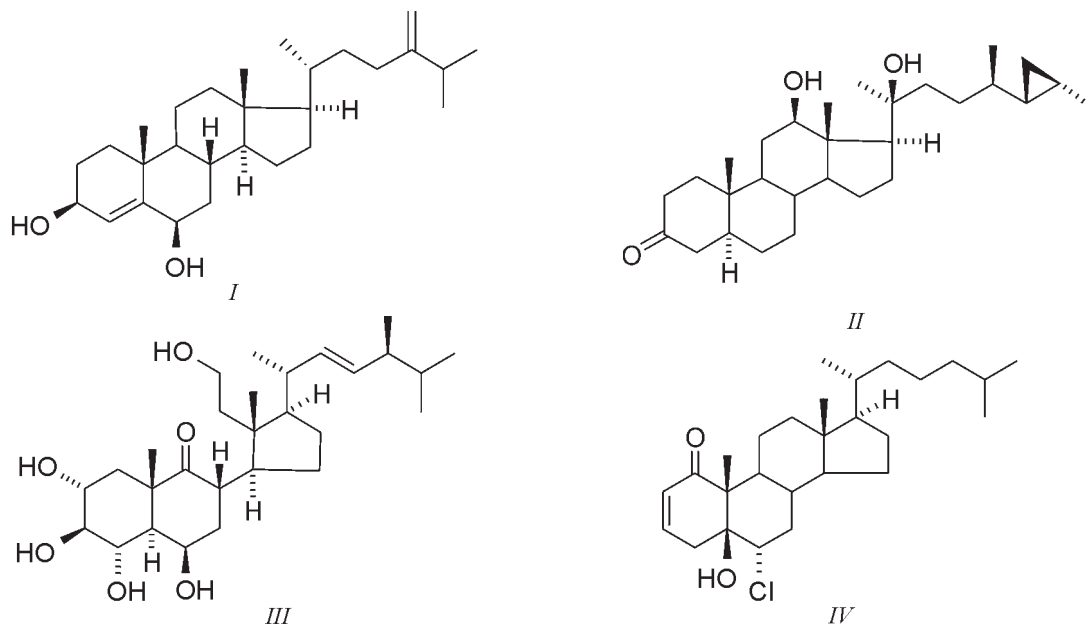


Obr. 2. Kreslení postranního vzorce dříve (A, B) a nyní (C)

Obr. 3. 5 ξ -Kard-20(22)-enolid (D) a 5 ξ -bufa-20,22-dienolid (E)



Obr. 4. 5ξ-Konan (F), 5ξ,25ξ-spirostan (G), 5ξ-spirosolan (H) a 5ξ,25ξ-solanidan (I)



Obr. 5. Nové typy sterolů

anelované heterocykly. Tak např. 5ξ-konan (F, obr. 4) je základem konesinu a jemu blízkých alkaloidů. Spirocyclické skelety – 5ξ-spirostan (G) a 5ξ-spirosolan (H) příroda používá dosti často: typ G se vyskytuje v nejdůležitějším aglykonu, z něhož se ve světě vyrábí většina steroidních léčiv. – diosgenin; dva kruhy jsou anelovány v 5ξ-solanidanu (I), od něhož je odvozena např. struktura solanidinu – alkaloidu vyskytujícího se ve formě glykosidů v různých druzích lilku, např. v bramboru².

Ještě jedno nomenklaturní překvapení Vás může potkat v literatuře: tvůrci některých monografií a databází nebo jejich nakladatelé odmítají znát řecká písmena, takže místo α a β použijí prostě α nebo β. Jejich počítačům to svědčí, uživatelům už méně.

3. Steroidy jako součást oboru přírodních látek

Řazení steroidů mezi přírodní látky je věcí historickou, protože dnes už je přírodních steroidů izolovaných z přírody méně než steroidů připravených v laboratořích parciální či totální syntézou. Badatelé zabývající se v první půli minulého století izolací přírodních látek steroidní povahy byli při výběru přírodniny často ovlivněni pouhou náhodou, v závěru století

ale již byli většinou vedeni záměrnou snahou nalézt aktivní princip té či oné léčivé rostliny. I dnes přitom mnohdy obdivujeme intuici starých kořenářek, které dokázaly odhalit použitelnost těch kterých rostlin.

Profesionálně tento přístup funguje dodnes v zemích třetího světa, kam pronikli agenti farmaceutických firem a zahrnují domorodé odborníky vším možným, jen aby od nich dostávali extrakty co nejširšího spektra produktů z domorodých léčivek. Tito badatelé pak touží po nalezení nové látky, která by byla jen mírně biologicky aktivní: jen tehdy si zajistí pokračování podpory ze strany farmaceutického průmyslu a svůj objev budou moci po nepřiliš dlouhé době publikovat. Nález vysoce aktivní látky se badateli nijak zvlášť nevyplatí, navíc musí slíbit firmě, že látku nebude publikovat po značně dlouhou dobu. Toto je jedním z příkladů toho, jak byly steroidy ze základního výzkumu vytlačovány právě penízi, resp. vidinou zisku z komercializace steroidních výrob. Farmaceutické firmy vyhledávají přírodní látky proto, aby získaly novou inspiraci pro své vlastní nové produkty. *Drug Discovery Today* cituje údaj³, že ze všech nových produktů, které byly v letech 1983 až 1994 uvedeny na trh (520), bylo 39 % přírodních látek nebo látek od nich odvozených.

Nově objevené přírodní látky steroidní řady zahrnují většinou deriváty cholesterolu, jejichž strukturní proměnlivost je

značná, často zahrnuje např. cytotoxické exomethylenoderiváty (např. látka *I*, obr. 5), antibakteriální cyklopropanoderiváty (jako látka *II*) nebo antifungální sekosteroidy typu *III*. Je známa i řada chlorem substituovaných přírodních látek typu *IV*. Zobrazeny jsou jen některé typy látek, které byly v nedávné době izolovány. Zvláště v poslední době jsou publikovány látky, které pocházejí z cytotoxicky působících materiálů a samy cytotoxicitu vykazují už proto, že postup separace byl řízen podle výsledků biotestů. Např. některé látky z rodiny uvedených 9,11-sekosteroidů typu *III* inhibují aktivitu protein C-kinasy⁴.

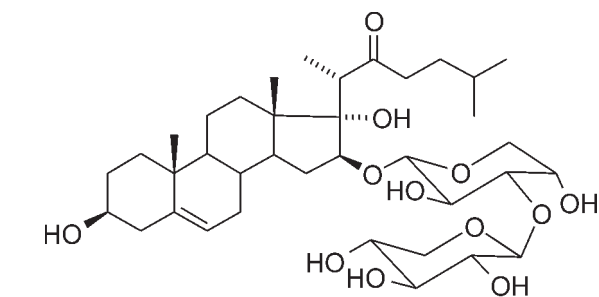
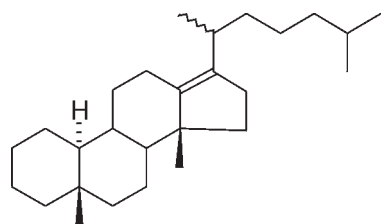
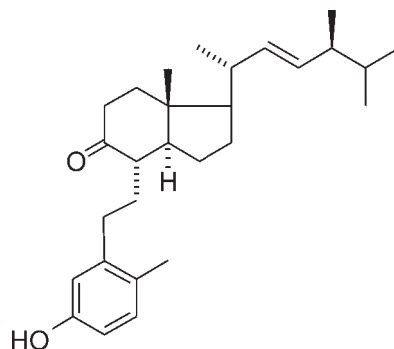
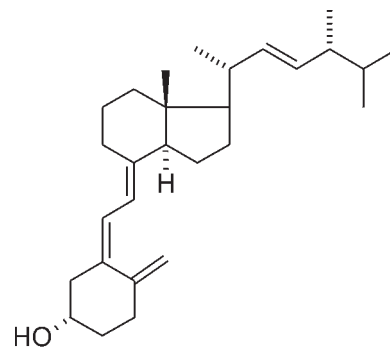
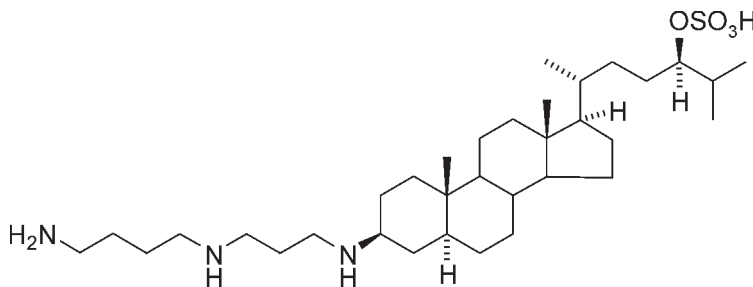
Díky biologickému sledování průběhu dělení bývají teď přírodní látky izolovány v nativní formě (dříve byly hlavně z technických důvodů získávány pouze jejich aglykony). Jednou z takto izolovaných látek s kancerostatickou aktivitou je OSW1 (*V*), derivát cholesterolu s cukerným zbytkem v poloze 16 α a oxoskupinu v poloze 22. Látka byla izolována z cibulek africké rostliny druhu *Ornithogalum* a objev její struktury ihned vyvolal odezvu mezi synthetiky, kteří připravili⁵ její aglykon metodou parciální syntézy.

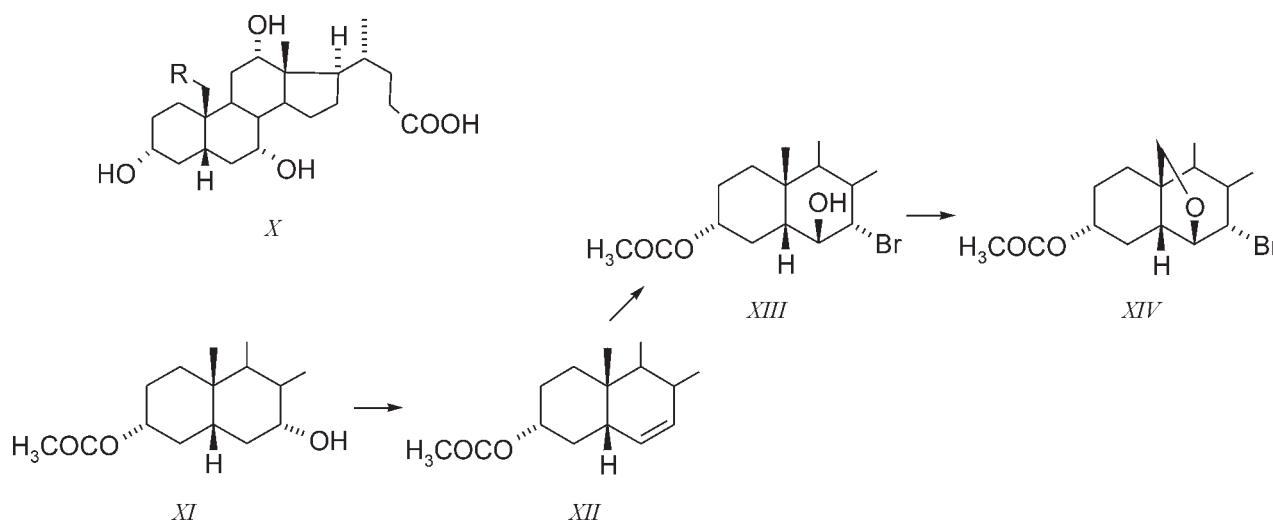
Přírodními látkami jsou vlastně i diacholesteny typu *VI*, protože i ty byly izolovány⁶ z materiálů nacházejících se

v přírodě (uhlí, ropa a ropné sedimenty). Jsou to produkty transformace sterolů prehistorických organismů na hlinkách za vysokých teplot. Jsou charakterizovány přesunem methylových skupin z poloh 10 a 13 do poloh 5 a 14, což dokážeme napodobit v laboratorii, když generujeme karboniový ion v poloze 5. Vynalézavost i úspornost přírody v tomto smyslu je obdivuhodná. Např. kalikoferol D – látka *VII*, izolovaná z korejské gorgonie⁷ rodu *Muricell*, je jen mírně modifikovaným vitaminem D (*VIII*), a přesto působí proti virům Herpes simplex I a II a proti viru dětské obrny.

Pojem přírodní látky často implikoval rostlinný původ těchto látek, což nebylo zcela přesné. Je pravdou, že extrahovat plevel rostoucí na zahradě bylo kdysi jednodušší než izolovat vysoce polární látky ze zvířecích tkání, ale se vzrůstající kvalitou separačních technik rostly i ambice přírodovědců. Izolace^{8,9} steroidního triaminu – skvalaminu (*IX*) vyžadovala techniky vzdálené tradiční steroidní chemii, která většinou pracuje s látkami lipofilními. Práce byla stimulována její aktivitou: skvalamin je totiž širokopásmové antibiotikum s kancerostatickou a antivirovou aktivitou (působí i na herpesvir a vir HIV).

Dalším motivem izolace přírodních látek bylo ověřování metabolismu jiných přírodních látek. Tak byl izolován 7 α -hydroxycholesterol a prokázán¹⁰ jako intermediát v biosyntéze cholových kyselin. Zjišťování metabolismu má vedle teoretického významu i význam praktický: ze znalosti metabolismu je možno lokalizovat zdroj eventuelních odchylek u pacientů a přistoupit k patřičné léčbě. Např. 19-hydroxylovaná cholová kyselina *X* (R = OH, obr. 6) byla v malém množství izolována¹¹ z neonatální moči, ale u dospělých byla taková hydroxylace pozorována jen u pacientů s poškozenými játry. Pro potvrzení navržené struktury byla opět použita parciální syntéza. Klíčovými stupni byla dehydratace chráněné kyseliny cholové *XI*,

*V**VI**VII**VIII**IX*



Obr. 6. Funkcionalizace polohy 19 (Ac = acetyl)

adice kyseliny bromné na Δ^6 -olefin *XII* a fotochemicky katalyzovaná oxidace angulární methylové skupiny v bromhydrinu *XIII* octanem olovičitým, následovaná redukcí bromepoxidu *XIV* zinkem a pak hydrogenací.

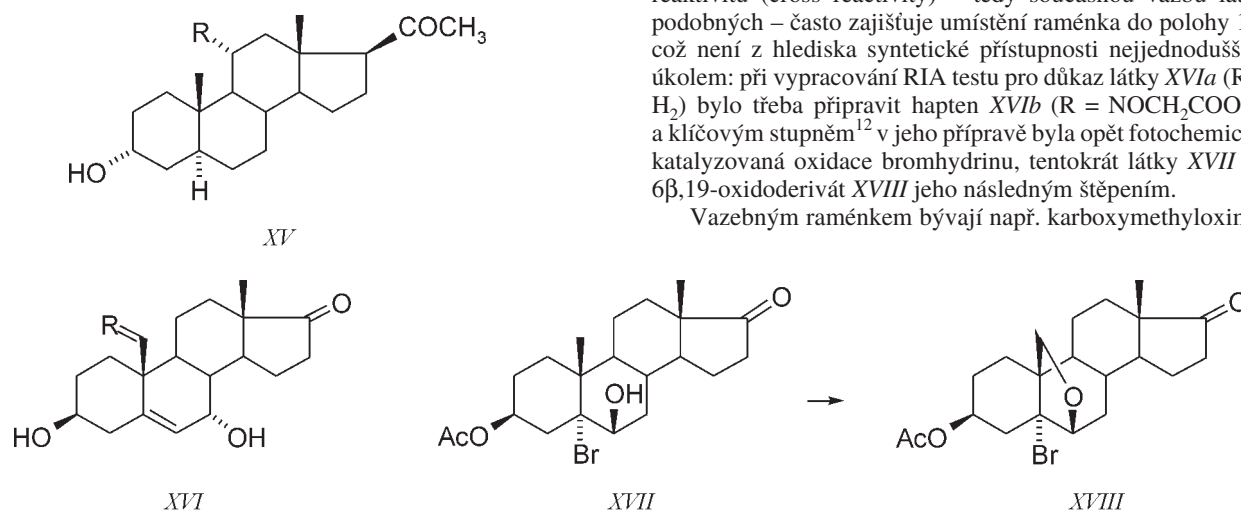
Pro studium osudu biologicky aktivních steroidů v organismu je často potřeba kvalitativní a kvantitativní důkaz přítomnosti nepatrných množství těchto látek v biologickém materiálu. Imunologické metody (např. radioimunologická analýza, RIA) může tyto služby poskytnout. Příklad zředění, s nímž RIA pracuje, byl publikován před letními olympijskými hrami: citlivost metody je taková, že by dokázala přítomnost kostky cukru ve velkém olympijském plaveckém bazénu.

Steroidy ale reprezentují příliš malou molekulu v těle, aby samy byly imunogenní. Proto se při vývoji testů pro imunitní stanovení steroidní látky funkcionalizují (např. zavedením vhodného „raménka“, anglicky „spacer“) na deriváty (tzv. hapteny), které se pak kovalentní vazbou navážou na molekulu vhodné bílkoviny (např. na hovězí imunoglobulin). Vzniklý

produkt (imunogen) slouží k vyvolání imunitní reakce v pokusném zvířeti, z jehož krve jsou pak příslušné protilátky získávány a diagnosticky využívány. Celosvětově rozšířené používání imunoanalýzy ve sportu i v lékařské diagnostice je tak zcela závislé na produkci vhodných haptenu.

Raménkem, které pak zprostředkuje kovalentní vazbu mezi analytem a bílkovinou, je např. volný karboxyl. Umístění tohoto raménka v molekule steroidu je kompromisem mezi chemickou dostupností takové funkcionalizace a požadavkem specifity protilátky. Má-li protilátka reagovat pokud možno pouze na hledaný analyt, musí být v haptenu zachovány všechny funkční skupiny esenciální pro danou aktivitu a raménko musí být umístěno co nejdále od těchto esenciálních skupin. Polohy 7 a 11 jsou vzdáleny od funkčních skupin A i D-kruhu, a tak jsou často využívány pro zakotvení takového raménka. Např. pro stanovení allopregnanolonu (*XVa*, $R = H$, obr. 7) bylo nutno připravit haptenu *XVb* ($R = CO(CH_2)_2COOH$), ale cesta k němu musela být zahájena mikrobiální hydroxylací vhodného intermediátu do polohy 11 α . Minimální zkříženou reaktivitu (cross reactivity) – tedy současnou vazbu látek podobných – často zajišťuje umístění raménka do polohy 19, což není z hlediska syntetické přístupnosti nejjednodušším úkolem: při vypracování RIA testu pro důkaz látky *XVIa* ($R = H_2$) bylo třeba připravit haptenu *XVIb* ($R = NOCH_2COOH$) a klíčovým stupněm¹² v jeho přípravě byla opět fotochemicky katalyzovaná oxidace bromhydrinu, tentokrát látky *XVII* na 6 β ,19-oxidoderivát *XVIII* jeho následným štěpením.

Vazebním raménkem bývají např. karboxymethyloximi-



Obr. 7. Příprava haptenu s raménkem v poloze 19

no- (CMO), karboxymethyloxy- (CME), hemisukcinyloxy- (HMSO) a podobné skupiny. U každého analytu je žádoucí připravit odlišné hapteny pro imunizaci zvířete a pro přípravu radioligandu, aby se potlačila možnost, že by nalezená protilátka byla specifická spíše pro ono raménko než pro vlastní analyt. Hapteny jsou využívány i v afinitní chromatografii. Tak při pátrání po receptoru přírodního brassinolidu byl příslušný brassinosteroid připojen k bílkovině T-aminoalkyl-esterovým raménkem.

4. Steroidní evergreeny

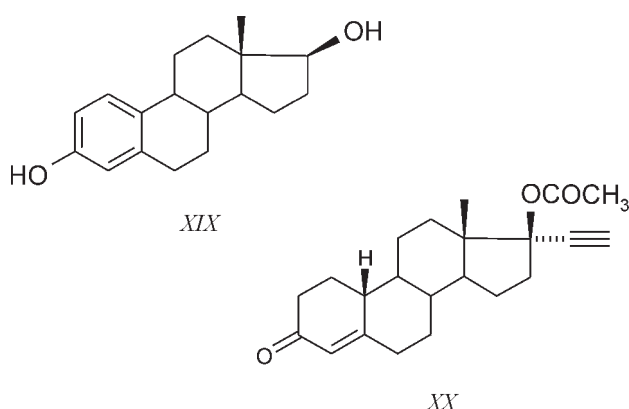
Písne věčně zelené jsou ty, které zazáří, po čase omrzí a pak v nových podmínkách jsou každou novou generací nově objevovány. Jsou to např.:

Estrogeny

Jednou z aktuálně sledovaných, ale dávno známých látek je estradiol (estra-1,3,5(10)-trien-3,17 β -diol, XIX). U fertilních žen je skoro výhradně produkován ve vaječnících řízených tzv. folikuly stimulujícím hormonem (FSH) a jeho funkce v reprodukčním cyklu je dobře známa. Poměrně nedávno se ale ukázalo, že estradiol hraje významnou roli v metabolismu lipidů (a tím i ve výskytu kardiovaskulárních chorob), v metabolismu kosti (estradiol stimuluje činnost osteoblastů a inhibuje aktivitu osteoklastů, čímž chrání kost před osteoporózou), ve výživě sliznic (s důsledky gynekologickými, urologickými, dermatologickými a otorhinolaryngologickými) a ve funkci mozku. Dlouho jsou známy psychické důsledky nadprodukce estrogenů (náladovost, deprese, nespavost, předrážděnost, nesoustředěnost), nově byla poznána neuroprotektivní¹³ role estrogenů v mozku: klinická zkušenost ukazuje, že vyšší hladina estrogenů chrání před nástupem i postupem Alzheimerovy choroby a obecně před poškozením mozku. Mozek dokonce sám v případě určitého poškození zvyšuje jak produkci estrogenů, tak produkci estrogenních receptorů v místě poranění. Mechanismus tohoto ochranného působení není zatím znám, někteří autoři¹⁴ spekulují o tom, že estradiol modifikuje strukturu buněčných membrán.

Všechny tyto oblasti jsou zasaženy při menopauze, při níž dochází k definitivnímu přerušení cyklických interakcí mezi vaječníky, hypothalamem a hypofýzou, při níž už vaječníky nereagují na gonadotropní stimulaci, neprodukují estrogeny ani progesteron a negativní zpětná vazba k hypofýze je zrušena, což vede k vysoké hladině LH a FSH hormonů. Estrogeny pak s nízkým výtěžkem produkují jen nadledvinky, a to aromatizací androstendionu.

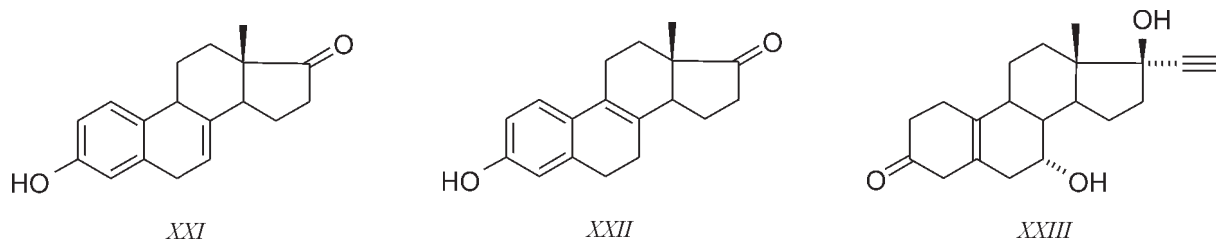
Přehledné články popisují účinky suplementace estradiolu



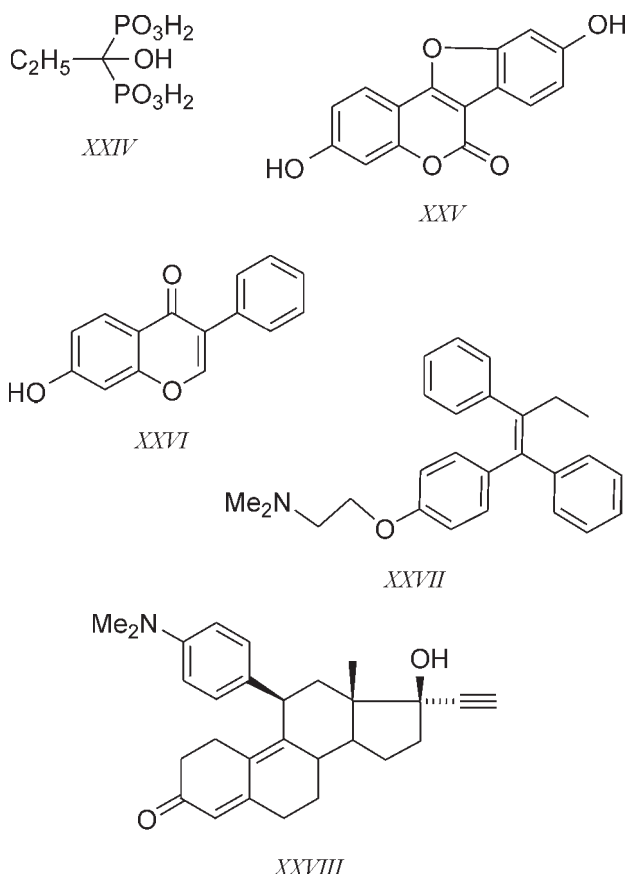
při zkouškách na mnoha tisících pacientek, kde vedle příznivých kosmetických účinků, vlivu na kardiovaskulární soustavu a úlevu všech postmenopauzálních příznaků (proměnlivé náladu, návaly a bolestivost styku) byly diskutovány i další pozitivní účinky. Nově byl prokázán účinek estrogenů na prevenci osteoporózy: kost je živou soustavou, v níž se znova a znova ustavuje dynamická rovnováha mezi tvorbou nových buněk a resorpcí buněk starých. U žen ve fertilním období je takto “remodelováno”, 10 až 25 % kostní hmoty ročně¹⁵. Pokud nejsou receptory estrogenů v těchto buňkách syceny estradiolem – ať už vlastním nebo medikovaným, proces resorpce starých buněk probíhá rychleji než tvorba buněk nových.

Zásah do hormonální rovnováhy bývá vždy riskantní. Nežádoucím vedlejším účinkem podávání estradiolu po menopauze je zvýšené riziko výskytu rakoviny dělohy. V současné praxi se už podává samotný estradiol jen pacientkám bez dělohy. Ostatní pacientky dostávají s estradiolem i subfyzilogické množství gestagenu (např. 17 β -acetoxy-17 α -ethinyl-19-norandrost-4-en-3-on, „norethisteronacetát“, XX), který riziko rakoviny dělohy výrazně omezuje. Tato terapie byla ověřována řadou studií na mnoha desítkách tisíc pacientek a ukazuje se, že bonus kardiovaskulární ochrany a snížení rizika rakoviny tlustého střeva je mnohem významnější, než je riziko rakoviny dělohy. I když odhlédneme od zlepšené kvality života uživatelé hormonální substituční léčby (HRT), ukazuje se, že v dlouhodobém pohledu je přežívání těchto pacientek významně vyšší než u žen hormonální substituci neužívajících¹⁶.

Steroidní chemie reagovala na zvýšenou poptávku po antiosteoporotických léčích syntézou a testováním řady analogů estrogenů. Dobré renomé si v tomto směru získal Premarin, což je estrogeně působící směs získávaná z moči březích kobyl. Převážnou většinu tvoří dehydroestron a dehydroestra-



Obr. 8. Antiosteoporoticky působící steroidy



Obr. 9. Další látky použitelné v boji proti osteoporóze

dioly s jednou dvojnou vazbou v poloze 7 (ekvilin XXI a příslušné 17-alkoholy, obr. 8), nebo dvěma dvojnými vazbami v B-kruhu (ekvilenin a příslušné 17-alkoholy). Nově se tvrdí¹⁷, že isomer ekvilinu s dvojnou vazbu v poloze 8 (9) (XXII, „8-dehydroestron“) je sice řádově méně účinný v děložce a v prsu, ale zato 10× účinnější v kosti. Jinak převládá názor, že nejúčinnějším estrogenem v tomto směru je ekvilin (XXI), který má u člověka menší hormonální aktivitu než estradiol, a tím vyšší terapeutickou účinnost na kost.

Farmaceutický průmysl zatím reagoval po svém na potenciál estrogenů snížit riziko osteoporózy u postmenopauzálních žen. Vedle pilulek, gelu a různých náplastí obsahujících řádově miligramová množství klasického estradiolu a syntetického gestagenu na den, byly vyvíjeny nové analogy. Za všechny uvedu 7 α ,17 β -dihydroxy-19-norpregn-5(10)-en-20-in-3-on (XXIII, Livial¹⁸). Měření ukazuje žádoucí nárůst kostní hmoty během jednoho roku léčení. Látka přitom stimuluje hypothalamo-hypofyzární systém tak, že vasomotorické poruchy (návaly, pocení) jsou potlačeny, hladina endorfinů je obnovena, ale endometrium (tedy nechtěné krvácení) stimulováno není.

Steroidní chemici byli jen jednou částí týmů, které osteoporózu nazíraly z mnoha různých úhlů, aby bylo možno intervenovat při vzniku choroby v různých stadiích vzájemně souvisejících procesů. Tak např. zvýšení dodávky vápenatých solí do kosti zaručovala zvýšená resorpce vápníku ze střev,

které bylo dosahováno podáváním peptidického hormonu kalcitoninu. Podobný efekt, byť dosahovaný jiným mechanismem, měly kalcium chelatující bifosfonáty jako etidronát (XXIV, obr. 9) a jeho analogy. Jejich dlouhodobé používání přináší však jiná rizika: tyto látky jsou současně inhibitory biosyntézy steroidů¹⁹.

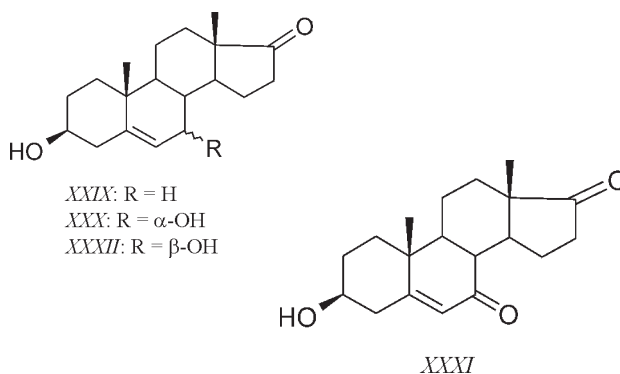
V rostlinné říši byla poznána řada fytoestrogenů, jejichž estrogení aktivita nebyla vždy zcela žádoucí^{20,21}. Jedním z fytoestrogenů je kumestrol (XXV), je tak strukturně podobný estradiolu, že ho můžeme pojmenovat steroidní nomenklaturou. I u ipriflavonu (XXVI) jsou popisovány²² protektivní účinky vůči kosti. Pěstitelé stád si ovšem kvality kostí svých jatečných zvířat příliš necení, zato ztrátu jejich plodnosti způsobovanou fytoestrogeny nesou nelibě.

Při testování vlivu všech možných kombinací známých látek na kost bylo zjištěno, že tzv. tamoxifen (XXVII), který v prsu funguje jako antiestrogen (tedy inhibuje růst estrogen-dependentních nádorů), v kosti působí jako estrogen, tedy udržuje vysokou kostní hmotu. Tamoxifen vzdáleně připomíná estradiol, jeho modernější verzi je ve vodě rozpustnější derivát raloxifen, který zase má nepříznivé účinky na centrální nervovou soustavu. V kosti ale působí příznivě, tlumí činnost osteoklastů, má tedy antiresorptivní účinky.

Je třeba říci, že na rozdíl od receptorů jiných hormonů jsou estrogení receptory nejméně náročné na přesné dodržení struktury (teprve nedávno byla pomocí rentgenografické analýzy studována struktura komplexu estradiolu a jeho receptoru²³). Antiosteoporotická aktivita byla nakonec nalezena i u estradiolu nepříliš podobného antigestagenního preparátu RU486 (XXVIII, „mifepristone“), který je jinak používán jako abortivum.

D H E A

Jinou látkou, které se v nedávné době dostalo obrovské pozornosti, je DHEA (dehydroepiandrosteron, tj. 3 β -hydroxy-androst-5-en-17-on, XXIX, obr. 10). O té se napsalo několik knih např. *Unlocking the Secrets to the Fountain of Youth* nebo materiály z konference newyorské akademie věd věnované této látce²⁴. V souvislosti s ní se objevují epiteta jako „pramen mládí“, „matka všech hormonů“ apod. Tato látka patří mezi tzv. „orphan drugs“, tedy látky, které svého času nebyly komerčně využity jen proto, že se staly veřejným majetkem, a žádná firma tedy neinvestovala do jejich vývoje, protože neměla zaručenu návratnost svých investic. Nedávno ale byl



Obr. 10. DHEA a jeho deriváty

vývoj těchto „sirotčích“ látek podpořen z federálních zdrojů a to mohl být impuls k novému zájmu.

DHEA byla poprvé izolována v roce 1934 a její strukturu vyřešil ve stejném roce Růžička. Po mnoho dekad byla průmyslovou surovinou pro výrobu steroidních hormonů a jejich syntetických ekvivalentů. V těle byl tento metabolit cholesterolu považován za rezervní stavební materiál, z něhož si tělo v případě potřeby vybudovalo jiné potřebné látky, např. testosteron nebo estradiol. Mimochodem, DHEA je vedle cholesterolu nejrozšířenějším steroidem v lidském těle.

Žádná vlastní fyziologická funkce nebyla u DHEA předpokládána ani později, kdy bylo zjištěno, že např. její nedostatek DHEA v plazmě těsně koreluje s atherosklerosou²⁵. Hvězdná dráha této látky začala studiím steroidního metabolismu krys, při němž se ukázalo, že třebaže krys nadledvinky tuto látku vůbec neprodukují, v jejich mozku se vyskytovala ve velkém množství. Radioaktivní DHEA, vpravená do krysího mozku, byla vyplavena během 20 hodin, takže vysoká hladina DHEA v mozku nemohla být dána selektivním skladováním DHEA produkované v extraadrenálních zdrojích. Tak vznikla představa o neurosteroidech, které si mozek produkuje sám pro svou vlastní potřebu.

Člověk má nejvyšší hladinu DHEA v mládí (mezi 20. a 30. rokem), v 70 letech má už jen 20 % hladiny svého mládí. Plazmatická hladina DHEA byla u obyvatel domovů důchodců nepřímo úměrná přítomnosti mozkových syndromů a stupni jejich závažnosti. DHEA *in vitro* zvyšovala přežívání neuronů a gliových buněk, *in vivo* zlepšovala paměť a retenci starých myší. Snížovala věkem dané důsledky pro imunitní systém a chránila degeneraci hippocampu způsobovanou glukokortikoidy. Mechanismus některých těchto účinků byl tentativně vysvětlován inhibicí pentosového cyklu, který může být zdrojem volných radikálů, a regulací produkce IL6 a IL10, která roste s věkem. Stimulace imunity není pravděpodobně²⁶ působena přímo DHEA, ale jejími metabolity: DHEA se částečně metabolizuje nejprve na 7 α -hydroxyderivát XXXI, ten se oxiduje na 7-oxoderivát XXXI, a ten se redukuje na 7 β -hydroxy-DHEA (XXXII). Z látek XXXI až XXXII má aktivitu anti-glukokortikoidní jen látka 7 β -hydroxyderivát XXXII.

Ve světě nadbytku, kde jednou z civilizačních chorob je obezita, se stal velkým motivem pro studium účinků DHEA její antiobezitní účinek. DHEA totiž patří mezi tzv. ergosteroidy, tedy látky, které stimulují spálení přijaté potravy bez ukládání rezerv. Docilují toho tím, že indukují tvorbu mitochondriální dehydrogenasy glycerol-3-fosfátu a glukoso-6-fosfatasy²⁷. Tento efekt nakonec nebyl u lidí tak markantní jako u krys právě proto, že pro krys byla DHEA na rozdíl od člověka velmi nedostatkovou komoditou.

Už v kůži dochází k hydroxylaci steroidů do polohy 7 α , proto byl vysloven předpoklad, že transdermální aplikace je účinnější než perorální nejen proto, že tím se vyloučí ztrátová cesta zažívacím ústrojím, ale i proto, že už v procesu resorpce je DHEA částečně konvertována na účinnější metabolit.

Jednou věcí bylo nalezení korelace mezi hladinou DHEA a věkem, jinou věcí je možnost jejího využití v terapii, tedy možnost zpomalit stárnutí mozku dlouhodobou suplementací DHEA. U krys se tento příznivý efekt potvrdil, třebaže zvýšená kortikální peroxidace signalizovala určitý negativní vedlejší účinek. Otázka zněla, zda tentýž efekt bude fungovat u lidí, jimž v žilách normálně koluje o několik řádů víc DHEA. Pokusy na dobrovolnících²⁸ (byla to naše DHEA a naši dob-

rovolníci) ukázaly, že DHEA dobře proniká do těla i z emulgelu a už po týdenní aplikaci příznivě ovlivnila řadu endokrinních parametrů: byly sníženy hladiny testosteronu, estradiolu a „celkového cholesterolu“, zvláště LDL, a zvýšeny hladiny LH, HDL-cholesterolu a apolipoproteinů A-I. Celkový atherogenní index prudce klesl. Zdá se, že všechny pozitivní efekty mají dva základní kořeny: schopnost DHEA ovlivnit hospodaření s lipidy (kardiovaskulární efekty, obezita, imunita) a schopnost modifikovat činnost mozku.

Nevýhodou dlouhodobého podávání je skutečnost, že DHEA může být v těle konvertována na testosteron a nakonec na estradiol. Umístění oxoskupiny do allylové polohy za vzniku dionu XXXI (7-oxo-DHEA) zmenšilo možnost konverze na tyto hormony, navíc je 7-oxo-DHEA ve svých nehormonálních účincích ještě silnější²⁹. Důvodem vyšší aktivity dionu může být i to, že u 7-ketonu je potlačena aromatizace DHEA, která je z hlediska aktivity ztrátová. Účinek DHEA a její 7-ketonu je v současné době intenzivně studován na různých lékařských – hlavně gerontologických a endokrinologických pracovištích.

Dílčí výsledky prokazují, že podávání DHEA způsobuje u experimentálních zvířat a někdy i u lidí zvýšení imunity³⁰ vůči virové infekci, kardiovaskulárním chorobám a rakovině prsu. Hladina DHEA pozitivně koreluje s hladinou „insulin-like“ růstového hormonu. Někteří účastníci konference o DHEA tvrdili, že DHEA je multifunkční steroidní hormon, ale jiní poukazovali na to, že nemůže být hormonem, když není možno nalézt specifický receptor pro DHEA. Třebaže může být metabolizována na testosteron a estradiol a jejich deriváty, plný účinek DHEA není možno vysvětlit pouhou konverzí na kterýkoliv známý hormon.

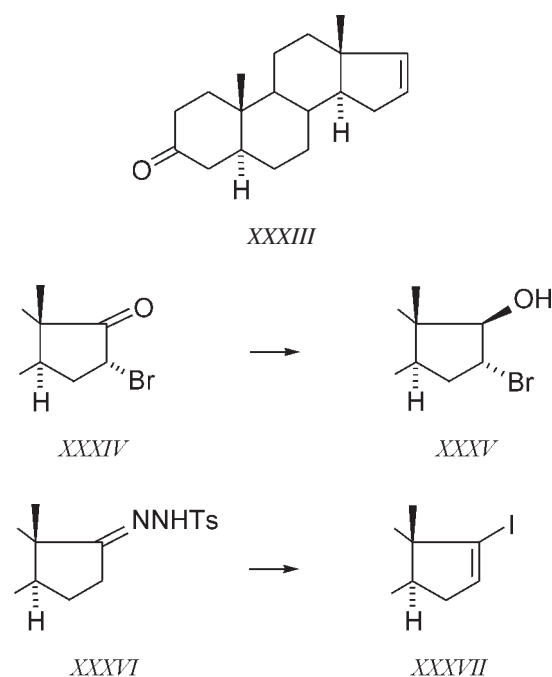
Biologické a elektrofyziologické experimenty prokazovaly, že DHEA je silným allosterickým inhibitorem γ -aminomáselné kyseliny (subtyp A, GABA_A), a jako takový např. může zlepšit paměť nebo příznivě ovlivnit průběh Alzheimerovy choroby. Přitom bylo zřejmé, že DHEA, resp. její transportní forma – sulfát (v literatuře označovaná jako DHEAS), je nejen po cholesterolu nejčastějším steroidem v těle, ale že je jako neurosteroid produkována i v mozku.

Zcela nedávno byl nalezen receptor DHEA, jehož neexistence byla dosud argumentem proti tvrzení, že DHEA je opravdu hormonem. Receptor byl nalezen v endotheliální výstelce cév. Tento receptor aktivuje intracelulární G-proteiny a endotheliální syntasu oxidu dusnatého, což přibližuje DHEA účinku známé Viagry³¹.

Feromony

Skutečnost, že mezi steroidní látky patří i tzv. feromon kance (XXXIII, boar pheromone), je známa dávno. Byl poznán její efekt, který byl údajně ve světě využíván ve velkých chovech prasat. Ten spočívá v tom, že prasnice zaujme jinou polohu, když ucítí tento feromon a současně ucítí dotyk na zádech v době pro oplodnění optimální a v době mimo estrus. To mělo detegovat říji, a tak zamezit zbytečnému živení neplodících zvířat. Ve velkochovu bylo údajně problémem určen vhodný čas pro připuštění samce. V současné době se tato technika nepoužívá, pro detekci stačí přivést onoho samce na ukázkou a pak se dotknout citlivých míst na zádech, aniž by chemici museli připravovat smrduté látky.

Dvojná vazba do polohy 16 se zavádí buď bromací na



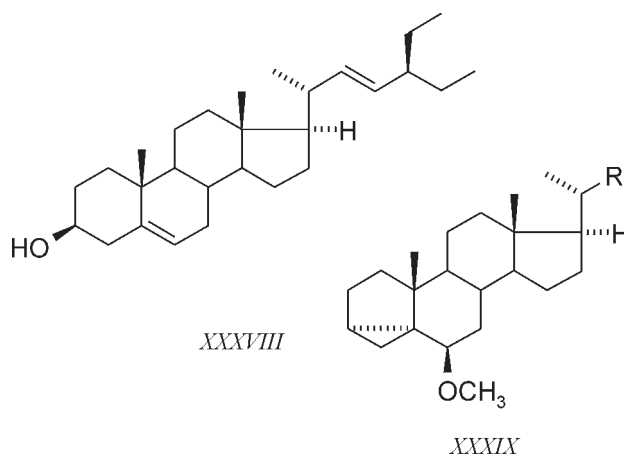
16 α -bromketon, XXXIV, redukcí na bromhydrin XXXV a jeho debromací na olefin XXXIII, nebo Bartonovou metodou převedením ketonu na tosylhydrazon XXXVI, jeho oxidací jodem a halogenolýzou jodu v látce XXXVII. Zmiňuji se o této dávno známé látce proto, že se jednak ukazuje, že feromon kance a jeho deriváty neprodukuje jen čtyřnozí samci, jednak proto, že role feromonů je studována ve stále hlubších souvislostech. Údajně ženy cítící androgenní pach aktivují hypothalamus v preoptické oblasti a ve ventromediálním jádru, zatímco muži cítící estrogenní pach aktivují hypothalamus v paraventriculární oblasti a v dorsomediálním jádru³².

5. Syntéza přírodních látek steroidní řady

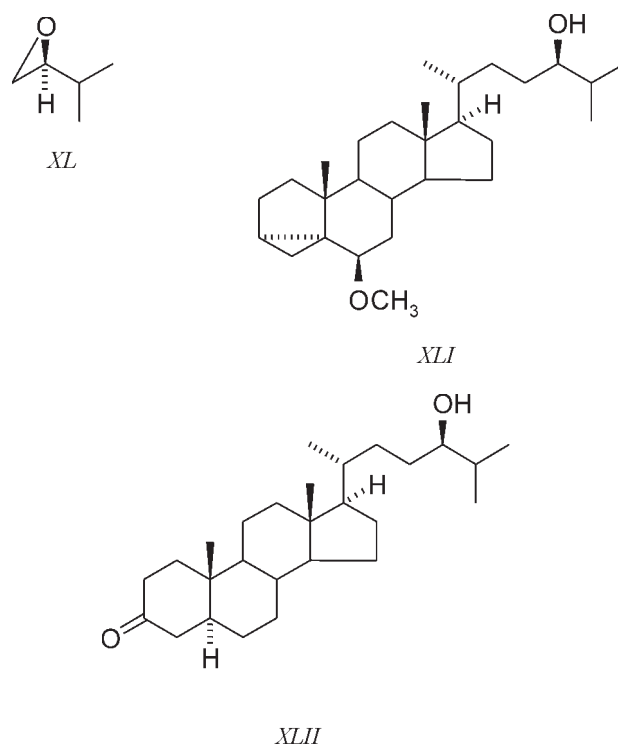
V dobách z hlediska chemie historických bylo běžné, že na základě určitých nalezených dat a analogií s blízkými látkami a často s přihlédnutím k pravděpodobné biogenezi, byla navržena její struktura, která pak musela být potvrzena (či vyvrácena) vstřícnou syntézou. Tento přístup je v současné chemii méně běžný, ale jsou situace, kdy je experimentálně nejjednodušší. Strukturní důkazy pomocí vstřícné syntézy vycházejí z hypoteticky odhadnuté struktury a pak korelace neboli převedením standardními postupy na látku již známou. Tato metoda je poměrně jednoduchá u klasických steroidních skeletů, u produktů komplexních přesmyků.

Příkladem vstřícné syntézy³³ může být potvrzení (24*R*)-konfigurace shora uvedeného skvalaminu (IX). Výchozí látkou byl stigmasterol (XXXVIII, obr. 11), který po ochraně kruhů A a B byl ozonizován na 22-aldehyd (XXXIXa, R = CHO). Aldehydicke skupina byla zredukována na hydroxylovou, primární alkohol byl převeden na jodid, který reakcí s fenylsulfínátem poskytl příslušný sulfon (XXXIXb, R = CH₂SO₂C₆H₅).

Druhá složka budoucího postranního řetězce skvalaminu



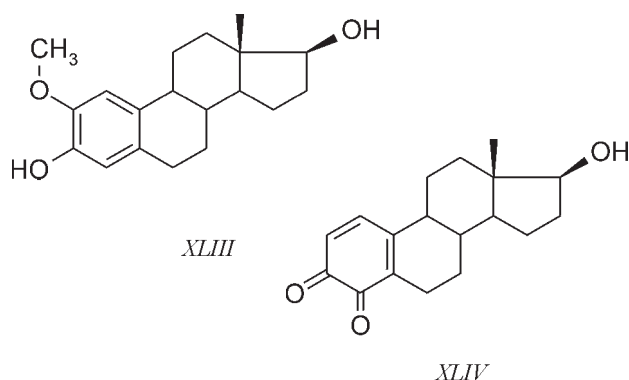
Obr. 11. Stigmasterol a jeho modifikace



Obr. 12. Výstavba postranního řetězce skvalaminu

byla získána z valinu takto: přírodní aminokyselina (tedy L-valin) byla diazotací s inverzí konfigurace převedena na hydroxykyselinu, která byla redukována na diol hydridem lithnohlinitým, tosylchloridem dehydratována na (*R*)-epoxid XL (obr. 12). Solvolýza tohoto epoxidu lithnou solí výše uvedeného sulfonu XXXIXb byl epoxidický kruh otevřen na méně substituovaném uhlíku za vzniku příslušného (24*R*)-24-alkoholu XLI.

Aminový řetězec byl ke steroidnímu skeletu připojen ve stadiu ketonu XLII, vzniklá Schiffova báze byla hydrogenována na dva produkty: 3 β -aminoderivát (24*R*)-řady byl shledán totožným s nativním skvalaminem, zatímco analogický produkt získaný z enantiomerního epoxidu byl zřetelně odlišný.



2-Methoxyestradiol

Jiný metabolit, který byl izolován, a navržená struktura potvrzena syntézou, je 2-methoxyestradiol (XLIII). Větší množství látky, které poskytla nová syntéza³⁴, umožnilo podrobné zkoumání aktivit. Tento metabolit vykazuje kancerostatickou aktivitu, zatímco další metabolit estradiolu, 4-hydroxyestradiol, má aktivitu opačnou. Ta se vysvětluje oxidací na 3,4-chinoidní derivát XLIV, který se váže přímo se složkami DNA.

Cefalostatin

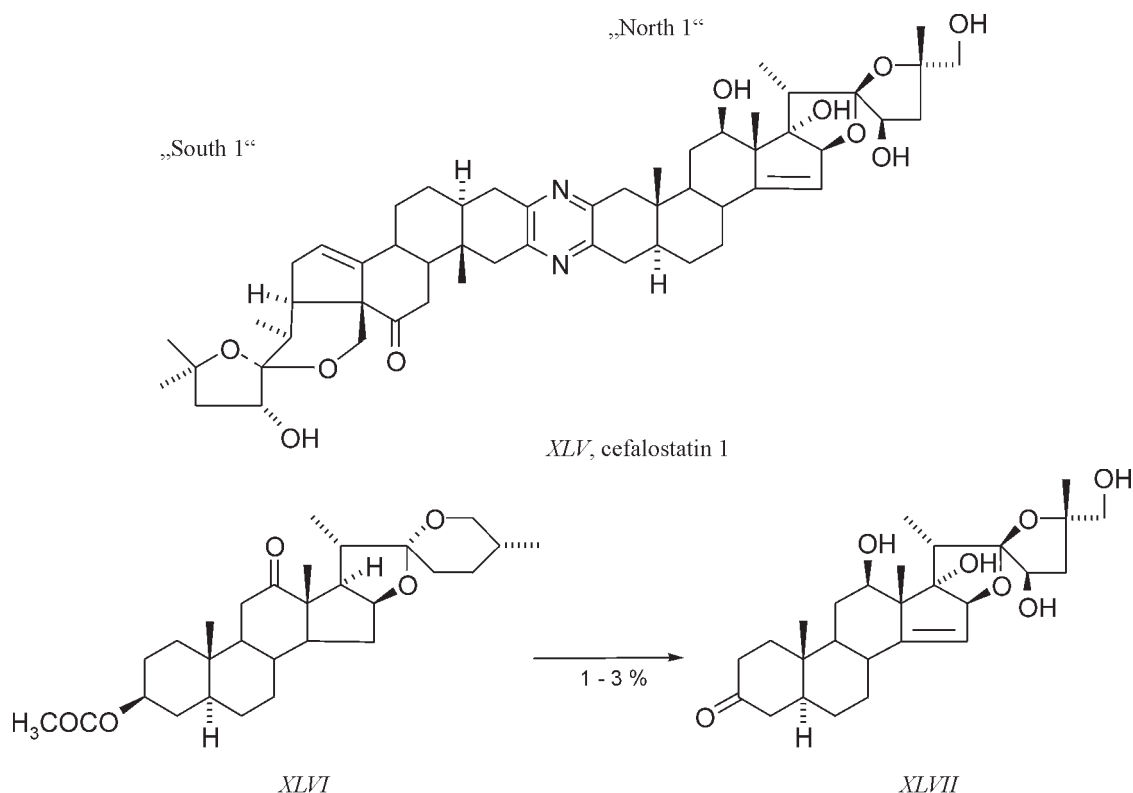
Chemické modifikace steroidního skeletu jsou dnes už propracovány tak, že je možno funkcionalizovat jakoukoliv polohu steroidního skeletu. Vzhledem k tomu, že steroidy jsou tu dnes diskutovány jako přírodní látky, zcela přeskočím

některé čistě syntetické oblasti steroidní chemie, které rovněž byly rozvíjeny v posledních dvaceti letech. Např. o funkcionalizaci neaktivovaných poloh steroidního skeletu se mohou zájemci dočíst v souhrnném článku³⁵.

Přetrvávající problémy stále spočívají v neslučitelnosti podmínek potřebných pro zavedení nové funkční skupiny s vlastnostmi či stabilitou přítomných funkčních skupin. I v tom učinila organická syntéza obrovský pokrok, když si uvědomíme, že v původní steroidní chemii existovalo jen pár základních triků, jak separovat reaktivity shodných funkčních skupin: parciální oxidace, parciální redukce, selektivní acylace, selektivní hydrolyza a hydrogenolýza.

Cefalostatin 1 (XLV, obr. 13) byl v roce 1998 uveden³⁶ jako jedna z „nejmocnějších protirakovinných látek, které kdy testoval americký National Cancer Institute“. ED₅₀ této látky vůči různým druhům nádorů a leukemií se liší, látka je ale vždy účinná v dávkách nanomolů na ml. Cefalostatiny jsou steroidem substituované pyraziny. Byly izolovány z mnohočetinatých červů druhu *Cephalodiscus gilchristi*, kteří žijí v Indickém oceánu. Strukturně blízké ritteraziny byly izolovány z druhu *Ritterella tokioka* žijícího na japonském pobřeží. Celkem bylo izolováno přes 40 různých variací na toto téma.

Klinické zkoušky byly brzděny nedostatkem přírodního materiálu, který je pochopitelný při nízké koncentraci těchto látek v přírodě. Např. pro 100 mg cefalostatinu bylo třeba zpracovat 450 kg červů. Ani sběr těchto živočichů, kteří žijí v hloubce 80 metrů, není jednoduchý, protože v těchto vodách je doma např. žralok bílý. Syntéza těchto látek má velký význam právě pro možnost studia jejich biologických vlastností. Vycházela z acetátu hekogeninu (XLVI), který rovněž



Obr. 13. Cefalostatin 1 (XLV) a výchozí hekogeninacetát (XLVI)

obsahuje zde typickou 12-oxoskupinu, spiroketalový systém anelovaný ke kruhu D a substituci v kruhu A. Ale jen intermediát s 3-ketoskupinou (XLVII), která byla potřebná ke spojení dvou molekul přes pyrazinový kruh, byl připraven ve 28 až 33 reakčních stupních a výtěžek činil 1 až 3 %.

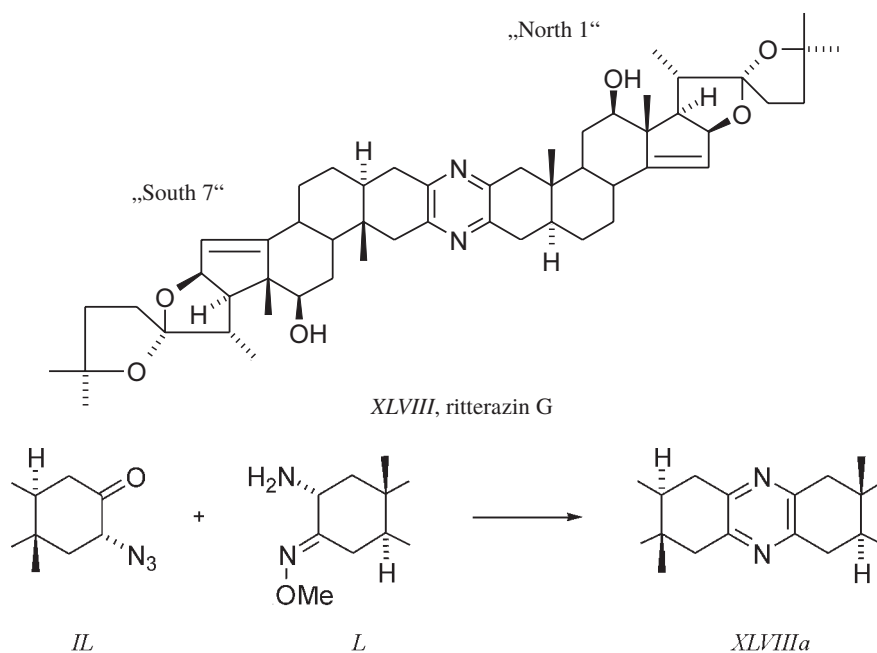
Cefalostatinům jsou strukturně blízké ritteraziny (např. ritterazin G, XLVIII, obr. 14). Díky menšímu počtu kyslíkatých substituentů ve spiroketalovém systému jsou synteticky přístupnější než cefalostatiny, při čemž jejich aktivita je v některých případech téměř stejná.

Strukturní variace se liší strukturou spiroketalových částí. Např. cefalostatin 1 (XLV) je tvořen pravou horní půlkou (tzv. North 1) a levou dolní půlkou molekuly (tzv. South 1). Ukazuje se, že jedenáct nejúčinnějších analogů obehává tyto dvě sho-

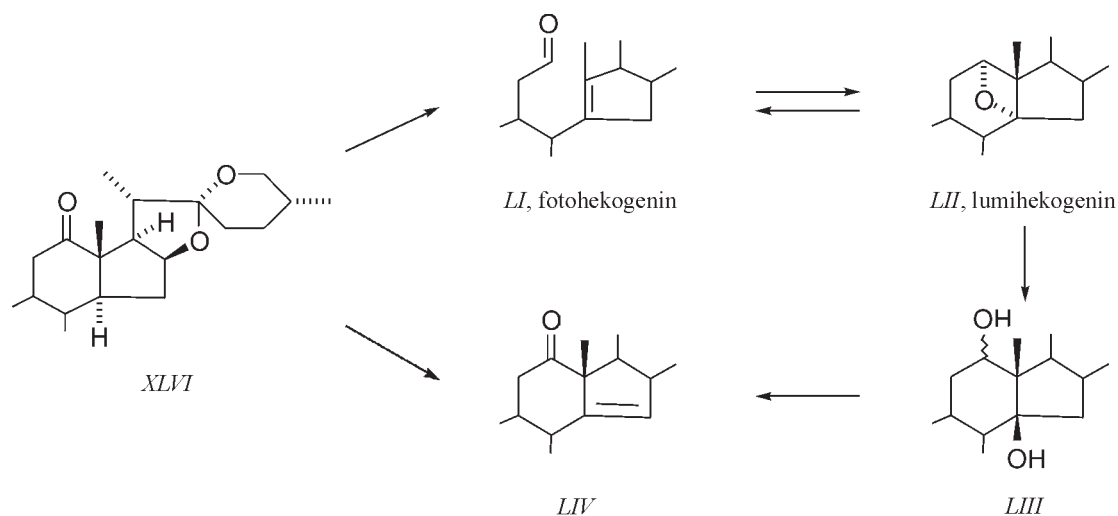
ra uvedené jednotky a ještě další dvě: „North G“ a „South 7“.

Konstrukce centrálního pyrazinového cyklu se provádí různým způsobem. V tomto případě byl výchozí 3-keton budoucí části South 7 převeden na 2 α -azidoketon IL a výchozí 3-keton budoucí části North 1 byl převeden na 2 α -amino-3-methoxyiminoderivát L. Při zvýšené teplotě a za kyselé katalýzy pak dochází k žádoucí cyklizaci na pyrazin XLVIIIa (cit.³⁵).

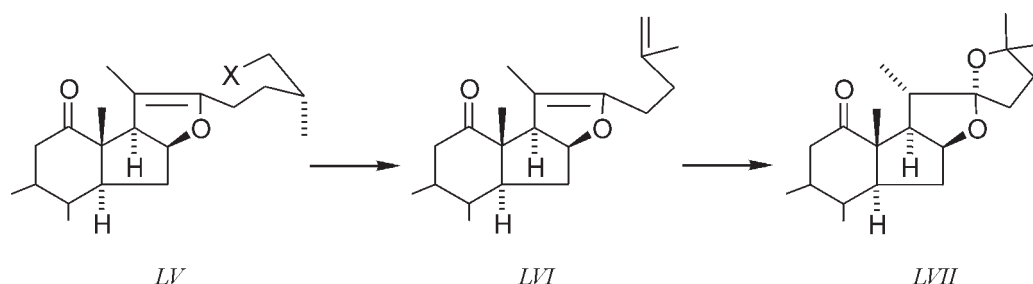
Tyto výchozí komponenty zase autoři připravovali takto: z příslušného 3-ketonu bromací získali příslušný 2 α -bromketon, který byl solvolyzován na žádaný 2 α -azidoketon IL. Druhá složka stejným postupem vedla k analogickému azidoketonu, který s reagoval s hydrochloridem N-methylhydroxylaminu.



Obr. 14. Ritterazin a způsob přípravy diazinu



Obr. 15. Zavedení dvojné vazby do polohy 14



Obr. 16. Modifikace spirostanové části hekogeninu

Kuriozní byl způsob zavedení dvojné vazby do polohy 14. Fotolýzou hekogeninacetátu (*XLVI*) vznikla rovnovážná směs fotohekogeninu (*LI*, obr. 15) a lumihekoneginu (*LII*), která za podmínek Prinsovy reakce po mnoha pokusech o optimalizaci poskytla $12\alpha,14\beta$ -diol *LIII*. Oxidace a dehydratace na nenasycený keton *LIV* pak proběhla bez komplikací.

Spirostanový skelet hekogeninu se mírně liší od požadovaného spiroketalového zbytku v cefalostatínu i ritterazínu. Transformace spirostanového derivátu na ritterazinový byla původně zamýšlena na podobném principu, na jakém je založena degradace diosgeninu při výrobě steroidních hormonů: tam se spiroketal štěpí při 200 °C působením anhydridu kyseliny octové. Tato reakce u 14β -hydroxyderivátu nevedla k cíli. Proto bylo nutno v hekogeninu nejprve modifikovat onu spiroketalovou strukturu a teprve potom fotolýzovat 12-oxoderivát s cílem zavést požadovanou dvojnou vazbu do polohy 14. Následující schéma popisuje princip této transformace: spiroketalové seskupení výchozího hekogeninacetátu *XLVI* bylo otevřeno dichloracetanhydridem na nenasycený dichloracetát *LV* (obr. 16, $X = Cl_2CHCOO-$), a ten byl sérií standardních reakcí (hydrolyza, tosylace, solvolýza tosylátu jodidem sodným, dehydrojodace) převeden na olefin *LVI*. K hydrataci tohoto enoletheru za vzniku furostanu *LVII* došlo po mnoha marných pokusech s různými činidly (octan rtuťnatý, trifluor-octová kyselina v acetonitrilu) působením vodné kyseliny octové při vyšší teplotě.

Cefalostatiny obsahují ve svých dvou spiroketalových skupinách ještě další hydroxylové skupiny, metodiku zavedení těchto skupin si může eventuelní zájemce přečíst v originální

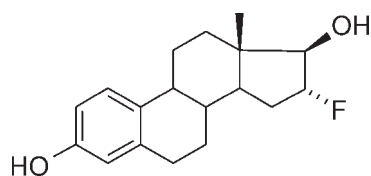
literatuře³⁷. Prezentace těchto klíčových stupňů měla jen řádově ukázat složitost syntetických postupů v dané oblasti.

6. Syntéza analogů biologicky aktivních steroidů

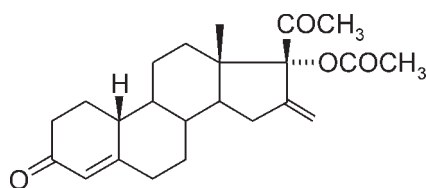
Vedle syntéz přírodních látek jsou v laboratořích často připravovány látky mírně modifikované – např. přítomností radioaktivního prvku. Deriváty značené deuteriem nebo tritiem jsou používány při důkazech metabolismu jednotlivých přírodních látek. Jindy tyto deriváty mají funkci diagnostickou. Je např. známo, že nádory hormon-dependentních tkání jsou v časných stádiích dobře manipulovatelné působením antihormonů, v pozdějších stádiích je již taková terapie neúčelná. Proto byl připraven 16α - $[^{18}F]$ fluoroestradiol (*LVIII*) a pacientka, již byl podán, byla sledována pozitronovou emisní tomografií (PET). Ta ukázala, zda ve tkáni jsou ještě funkční estrogení receptory a zda tedy má léčba antihormonem naději na úspěch.

V poslední době se v syntetické steroidní chemii stále víc uplatňuje trend, který Dr. Jaroslav Kalvoda z CIBY formuloval takto: „Dnes už publikace steroidní syntézy bez biologických dat působí skoro neslušně.“ Ubývá čistě metodických prací, v nichž steroidní skelet byl použit jako cvičná loučka pro demonstraci určité nové reakce, na druhé straně přibývá prací, v nichž chemie sice není příliš vzrušující, ale jejichž cenu dělá biologická aktivita takto získaných produktů. Steroidní chemik si už nevystačí sám, stále víc potřebuje spolupracovníky v biologických oborech, kteří dokáží, ale hlavně jsou ochotni naplno spolupracovat.

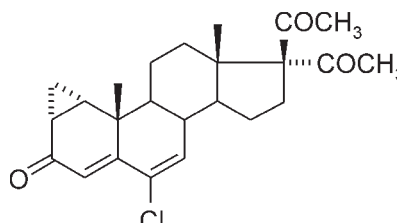
Práce mnoha týmů vede k upřesnění strukturních požadavků té které biologické aktivity. Jeden z mnoha impulzů, které steroidní obec ovlivňovaly ve snaze o zlepšení aktivity přírodních látek, byla potřeba separace aktivit původně spřažených



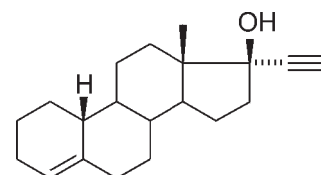
LVIII



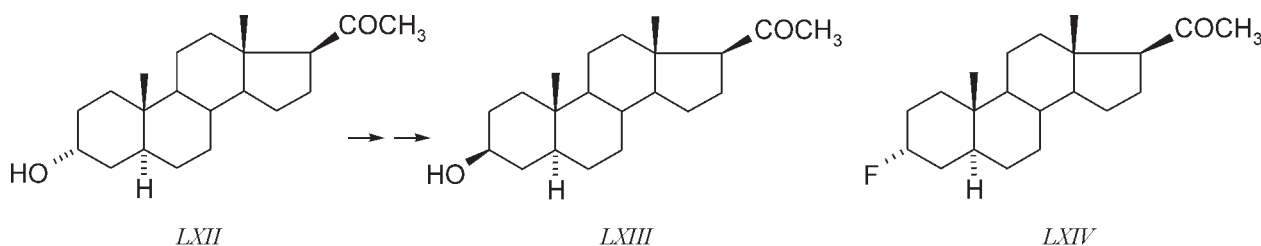
LIX



LX



LXI



Obr. 17. Stabilnější analog přírodní látky

dohromady. Nechci jen připomínat historický příklad androgenní aktivity, která byla později separována na tzv. čistě androgenní (rozvoj pohlavních orgánů i sekundárních pohlavních znaků) a anabolickou aktivitu (ukončování růstu dlouhých kostí, budování svalové hmoty). Máme i příklady novější: nestoron³⁸ (LIX). Ten pravděpodobně nahradí jiné gestageny v orálních kontraceptivech. Dosud používané gestageny (3-ketodesogestrel, norethindron, levonorgestrel) mají zbytečnou androgenní aktivitu, již jsou připisovány změny v hospodaření s lipidy, a v důsledku toho výskytu akné a přírůstků na váze. Nestoron v těchto testech má stejnou gestagenní aktivitu jako ostatní gestageny, ale jeho androgenní aktivita je 300 až 400 krát menší.

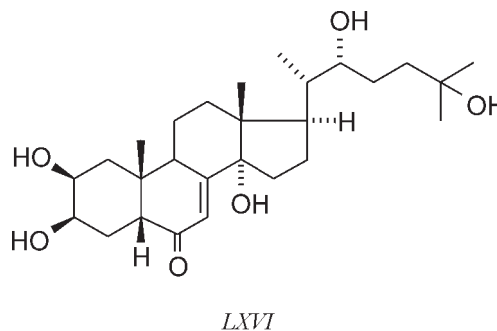
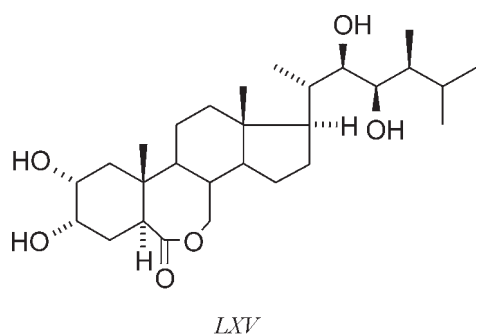
Hledání souvislostí mezi strukturou a aktivitou je cestou pokusu a omylu a pokrok často ovlivnila serendipity: např. pracovníci firmy Schering svého času usilovali o vytvoření gestagenu s co nejmohutnější aktivitou. Tak byl připraven jejich cyproteronacetát (LX), který nakonec v tomto testu propadl. Dóza s tímto preparátem zůstala stát na polici a když byla od stolu s předpokladem jisté symetrie v přírodě koncipována představa antiandrogenní aktivity, byl cyproteronacetát jednou z mnoha testovaných látek. A ukázal se být tak dobrý, že je používán při léčbě chorob androgen-dependentních orgánů dodnes.

Pracovníci farmaceutického průmyslu přitom želi současné praxe, při níž je použití testů na zvířatech silně omezeno. Bez nich by ale nikdy nebyla objevena účinnost např. desogestrelu (LXI), protože do té doby se věřilo, že pro aktivitu je zapotřebí neporušený ⁴-3-oxosystém. Desogestrel tedy podle této teorie neměl být jakkoliv účinný. Rutinní testy na zvířatech naštěstí tuto teorii vyvrátili, ale sítím dnešních testů by už desogestrel prošel neodhalen.

Dalším důvodem pro syntézu analogů je snaha o zvýšení stability účinné látky v těle. Např. tzv. allopregnanolon (3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-on, LXII, obr. 17) je jedním z tzv. neurosteroidů. Tento neurosteroid působí v mozku inhibičně: vazbou na receptor γ -aminomáselné kyseliny (GABA_A) zvyšuje účinek tohoto nervového přenašeče a zvyšuje útlum nervových signálů, jako je třeba signál bolesti. Účinek allopregnanolonu je okamžitý, ale rychle odezní: poločas deaktivace je 16 minut. Takové vlastnosti je možno využít jen pro velice krátkodobé případy, jako je třeba celková anestezie při operaci, která musí nastartovat rychle, ale je žádoucí, aby po skončení aplikace zase rychle odezněla. Protože v mozku je odhadem 40 % synapsí „GABA-ergních“ (jsou ovlivnitelné kyselinou γ -amino-máselnou), je možná použitelnost této skupiny neuroaktivních látek větší než jako pouhé celkové anestetikum. K systematickému použití ale vadí krátkodobost působení. Allopregnanolon je totiž rychle deaktivován oxidací na neak-

tivní 3-oxoderivát a pak redukcí na také neaktivní 3 β -hydroxyderivát LXIII. Proto jedna z cest vedoucích k prodloužení účinku byla náhrada jeho 3 α -hydroxyly atomem fluoru: výsledná látka LXIV se sice váže na receptor asi 4 $\times$ slaběji než původní allopregnanolon, ale její metabolická stabilita je tak vysoká, že celkový *in vivo* účinek je jak mohutnější, tak trvalejší.

Dalším důvodem syntézy přírodních steroidů je potřeba většího množství přírodních látek, než je možno získat izolací. Nalezení určité nové aktivity bývá začátkem dalších otázek, protože bývá nutno potvrdit či vyvrátit možné interakce těchto látek s dalšími systémy. Tehdy opět přichází ke slovu syntéza aktivní látky. Jednou takovou skupinou látek jsou brassinosteroidy, které jsou studovány z hlediska syntézy, analýzy i biologické aktivity. Dnes můžeme říci, že patří mezi rostlinné hormony, které se vyskytují ve všech rostlinách, a to ve všech jejích částech, nejvíce ale v reprodukčních orgánech, jako je pyl a nezralá semena. Stimulují růst buněk i jejich dělení, a tak působí i na celkový růst rostlin. Při externí aplikaci brassinosteroidů dochází hlavně ke stimulaci růstu té části rostliny, která se rozvíjí právě v době aplikace. Efekt externí aplikace je nejvýraznější u rostlin existujících v nepříznivých podmínkách, kdy pomáhá překonat nepříznivé faktory,



jako je sucho, nedostatek vody a živin apod. Z toho důvodu je o jejich možné využití takový zájem, protože jsou schopny dopomoci k optimálnímu růstu i v málo příznivých podmínkách, což by mohlo zamezit dnes tak rozšířenému nadužívání hnojiv.

Nejranější evidence o existenci této nové třídy rostlinných hormonů se objevila v r. 1968, kdy z půl tuny zelených listů *Distylium racemosum* byly izolovány tři frakce (celková váha 1 mg) s mnohem výraznějším účinkem na listy rýže, než vykazoval auxin. Další autoři nazvali podobné extrakty brassiny, poukázali na jejich účinek na více než desateronásobné prodloužení druhého internodu s tím, že účinek se liší od účinku giberelinu; ti také jako první formulovali názor, že jde o nový typ růstového hormonu rostlin. Po dalších deseti letech byly ze 40 kg pylu izolovány 4 mg brassinolidu (LXV) což už

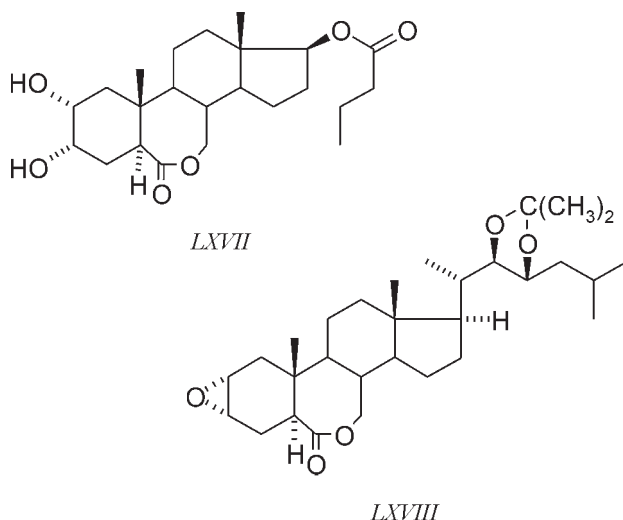
stačilo na prokázání struktury pomocí roentgenové difrakce³⁹. Vedle vzorce brassinolidu je pro srovnání uveden strukturně blízký představitel další skupiny rostlinných přírodních látek – ekdyson (LXVI). Tyto sloučeniny jsou studovány z hlediska interakce mezi rostlinami a hmyzem⁴⁰, jejich aktivita je ale zcela jiná – způsobují ekdysi, tedy přerod jednoho stadia hmyzu v další stadium.

Do dnešního dne byla izolována dlouhá řada brassinosteroidů, některé postrádají ty či ony strukturní rysy dlouho považované za esenciální pro brassinoidní aktivitu (často je laktónová skupina nahrazena tradičním cyklohexanonovým B-kruhem). Vzhledem k obtížné izolaci brassinosteroidů byla značná pozornost věnována izolaci a syntéze analogů brassinosteroidů. Některé analogy vykazují aktivitu sice slabší než brassinolid, ale zato jsou o několik řádů snáze syntetizovatelné. Studium vztahů mezi strukturou a aktivitou přináší mnohé dílčí poznatky, jejich integrace je však zatím bržděna rozdílností používaných biologických testů, které ne vždy dobře korelují spolu navzájem. Tak např. analog LXVII (obr. 18) je v testu na druhém internodu fazole stejně aktivní jako 24-epimer brassinolidu, zatímco v testu na rýži je jeho aktivita zanedbatelná. Také látka LXVIII se v druhém testu (tj. na rýži) jeví zcela nezajímavá, ale na poli zvyšuje výnos rýže nečekaným způsobem⁴¹. Takových případů je celá řada.

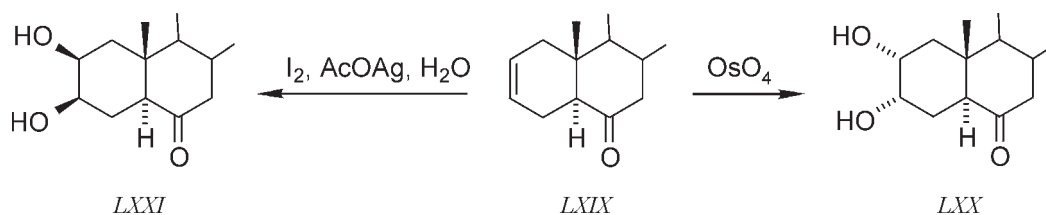
Nás jako chemiky bude nejspíš zajímat způsob zavedení jednotlivých funkčních skupin. Syntetické postupy se liší pořadím kroků, použitými činidly či způsoby ochrany jedné skupiny při obměně současně přítomných funkčních skupin. Na detailní rozbor všech postupů nezbyvá čas, ale jednotlivé dílčí kroky syntézy brassinosteroidů si připomenout můžeme.

Vicinální *cis*-diolové seskupení v A-kruhu je skoro vždy zaváděno oxidací příslušného γ^2 -olefinu (LXIX, obr. 19) ekvimolekulárním či alespoň katalytickým množstvím kyslíčnicku osmičelého (výjimku tvoří postup V. Černého⁴², který použití tohoto drahého činidla úplně vyloučil). Týž olefin LXIX je výchozí látkou i pro přípravu ekdysteroidů, jen činidlo je v tomto případě jiné.

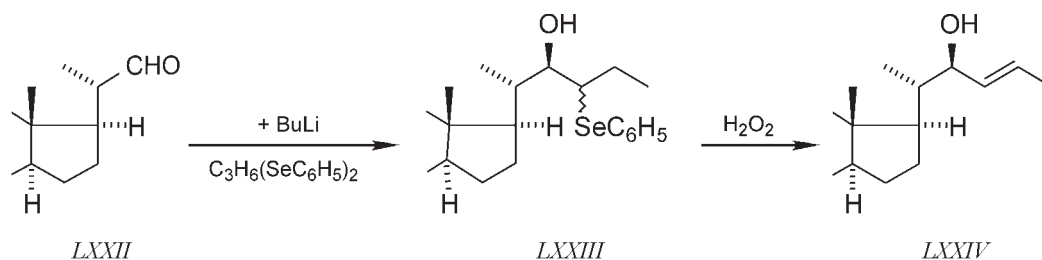
ϵ -Laktonové seskupení v B-kruhu brassinosteroidů bylo



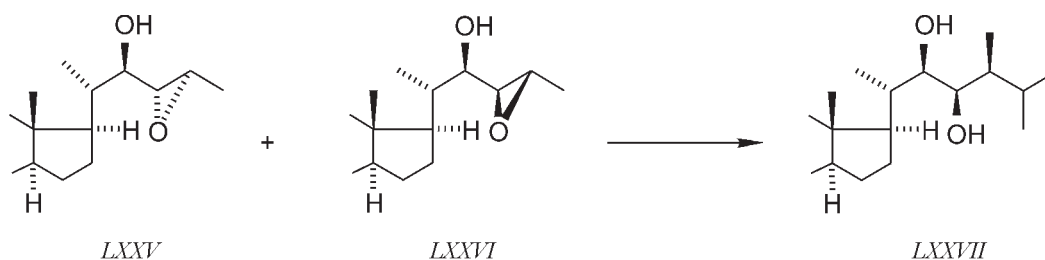
Obr. 18. Analogy brassinolidu



Obr. 19. *cis*-Hydroxylace v přípravě ekdysonu (LXXI) nebo brassinolidu (LXX)



Obr. 20. Výstavba postranního řetězce brassinolidu

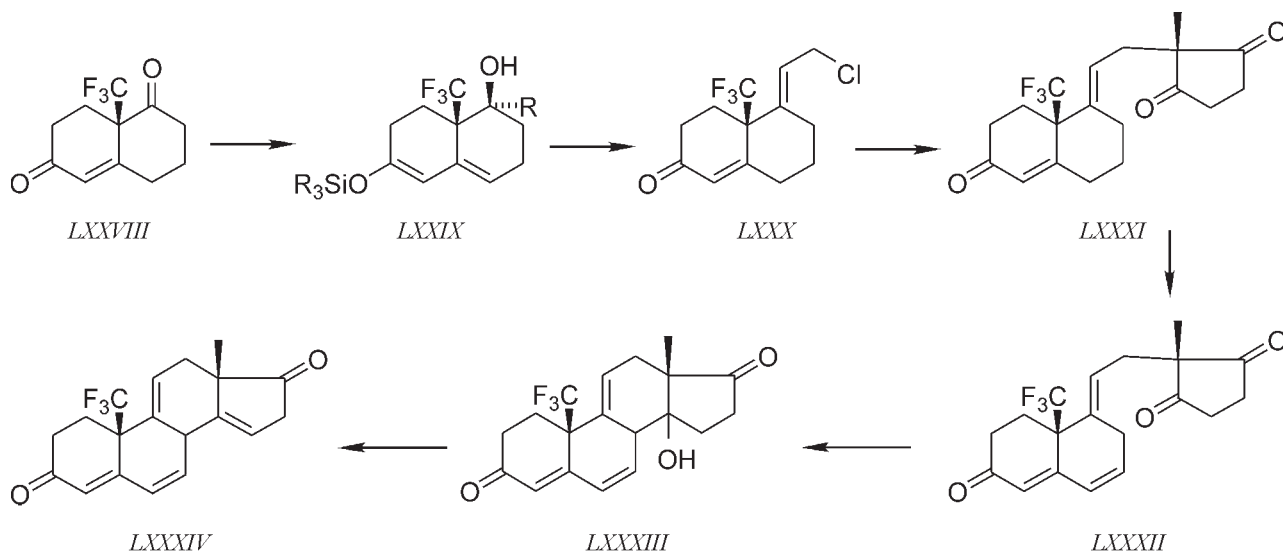
Obr. 21. (22*R*,23*R*,24*S*)-konfigurace postranního řetězce brassinolidu

vždy připravováno Baeyerovou-Villigerovou oxidací příslušného 6-ketonu typu *LXX*. Tato oxidace u těchto 3 α -hydroxy-6-ketonů typu *LXX* probíhá tedy s opačnou preferencí než u 3 β -hydroxyderivátů typu *LXXI*, kde kyslík přednostně vstupuje mezi uhlíky 5 a 6.

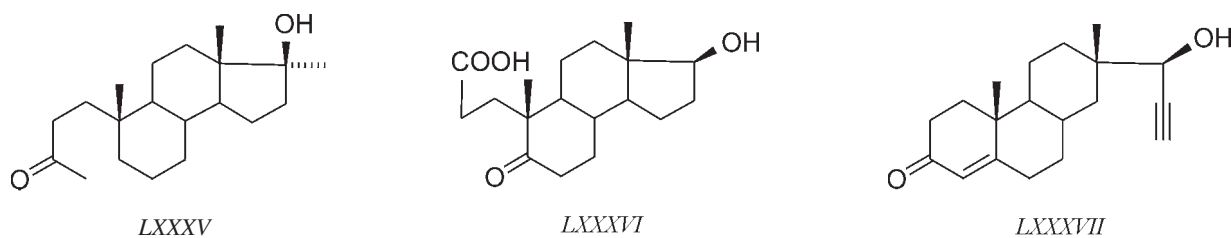
Zavedení postranního řetězce do molekuly bylo problémem řešeným mnoha školami, problémem o to těžším, že v tomto řetězci jsou 4 asymetrická centra. Přesto se na tento problém vrhla řada týmů, osmnáct z nich publikovalo své syntézy během osmnácti let. Výtěžkově zatím nejefektivnější cestu nakonec našel Tomáš Back z University of Calgary⁴³, který využil reakce C22-aldehydu *LXXII* (obr. 20) s tříuhlíkatým aniontem generovaným z fenylselenopropanu. Deselenylace intermediátu *LXXIII* poskytla převážně žádaný *trans*-olefin *LXXXIV*. Sharplesova oxidace při použití L-vinanu ethylného poskytla směs epoxidů *LXXV* a *LXXVI* (obr. 21). Posledně

jmenovaný reagoval s isopropylmagnesiumchloridem, hlavním produktem (80 %) byla látka *LXXVII* se strukturou brassinolidu v postranním řetězci. Dvanáctistupňová syntéza z aldehydu *LXXII* měla údajný výtěžek 8 %.

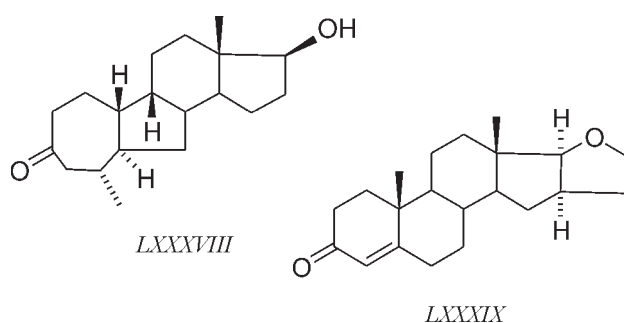
Většina chemických prací z oboru brassinosteroidů se v současné době věnuje hledání nových analogů a jejich testování. V tomto oboru pak je rozmanitost přístupů dána už jen fantazií autorů a jejich odvahou porušovat tabu: do určité doby se zdálo, že ϵ -laktonový systém v B-kruhu je pro brassinoidní aktivitu nepostradatelný, dnes už toto pravidlo neplatí. Cholestanový postranní řetězec se taky zdál být nutnou podmínkou aktivity, ale poznání vlastností 22-oxa-, 20-azacholestanových i androstanových analogů tuto podmínku podstatně modifikovalo. Práce v tomto směru pokračují dál, syntézy jsou např. vedeny i na základě faktorové analýzy dostupných dat a matematického modelování.



Obr. 22. Syntéza racemického derivátu androstanu



Obr. 23. Sekosteroidy



Obr. 24. Antiandrogenní analogy

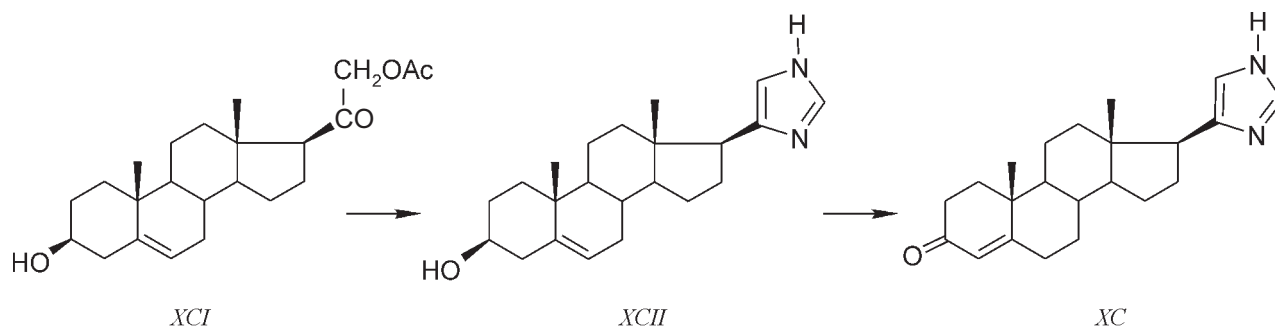
Zatím jsem tu popisoval parciálně-syntetické postupy, při nichž chemici vycházeli z jedné přírodní suroviny, aby získali jiné steroidy. Totální syntézy jsou v této oblasti rovněž používány. Např. Blazejewski a spolupracovníci⁴⁴ připravovali inhibitory cytochrom P450 aromatasy a získané trifluoroanalogy slibovaly být ireverzibilními inhibitory. Vyšli proto z tzv. Wielandova-Miescherova ketonu fluorovaného na angulární methylové skupině (LXXXVIII, obr. 22). Jedna ketoskupina v této látce byla ochráněna ve formě silylovaného enol-etheru a druhá pak reagovala s acetylidem lithným v kapalném amoniaku za vzniku ethynylderivátu LXXIXa (R = CCH). Jeho hydrogenace na Lindlarově katalyzátoru poskytla allylový alkohol LXXIXb (R = CHCH₂), a ten působením thionylchloridu poskytl přesmyknutý chlorderivát LXXX. Reakce chlorderivátu se sodným enolátem 2-methylcyklopentan-1,3-dionu poskytl sekosteroid LXXXI. Přímá cyklizace této látky byla neúspěšná, proto byla tato látka v několika stupních převedena na dienonový derivát LXXXII, a ten v alkalických podmínkách podlehl cyklizaci na derivát 14β-hydroxyandrostanu LXXXIII. Hydrogenace a dehydratace thionylchloridem v pyridinu poskytly 19,19,19-trifluor-androsta-4,6,9(11),14-

-tetraen-3,17-dion (LXXXIV). Hydrogenace se zdála být jen čistě technickou záležitostí. Asi nebyla, práce zatím zůstává v posledním stupni nedokončena.

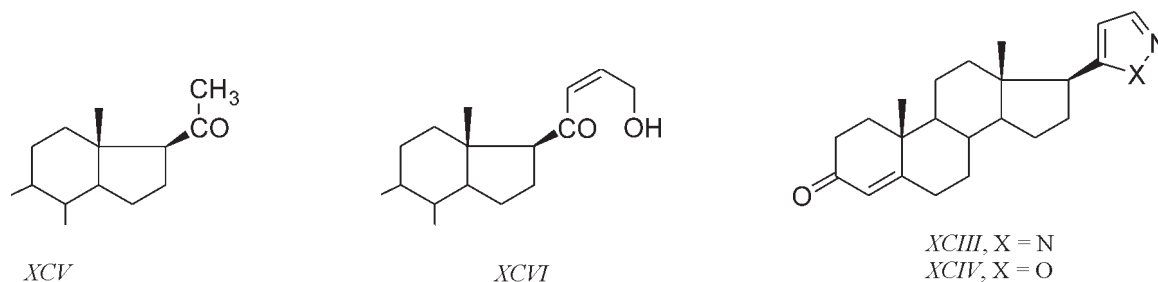
Ve snaze připravit nové typy biologicky účinných látek byly často modifikovány nejen substituenty, ale i skelet. Ze série analogů pravého androgenu – dihydrotestosteronu byl odvozen závěr, že nejlepším antiandrogenem bude látka co nejpodobnější tomuto hormonu, ale postrádající jeho rigiditu, taková látka by se vážala na androgenní receptor, ale nevnutila by mu změnu jeho konformace, tedy následnou vazbu receptorového komplexu na DNA a ani hormonální odezvu. Toto požadované uvolnění rigidity měl přinést např. 4,5-sekodihydro-testosteron (LXXXV, obr. 23). Látka byla připravena oxidací chráněného derivátu testosteronu na 5-oxo-3,5-sekokyse-linu LXXXVI a následnou sekvencí transformací⁴⁵ ale její antiandrogenní aktivita byla nižší než je aktivita používaného cyproteronacetátu. Podobná idea vedla jiné autory⁴⁶ k přípravě 14,15-sekosteroidu LXXXVII, který se nakonec ukázal být inaktivátorem dehydrogenasy 3α-hydroxysteroidů.

A-Homo-B-noranalogue dihydrotestosteronu LXXXVIII (obr. 24) měl v *in vivo* testech nejlepší účinek⁴⁶ v blokaci funkce androgenů, ale o této látce nelze mluvit jako o antiandrogenu, protože se v *in vitro* testech prakticky neváže na androgenní receptor. Zdá se, že tato látka je vlastně pro-antiandrogenem, který se až v živé tkáni metabolizuje na vlastní antihormon, pravděpodobně látku s dalšími dvojnými vazbami v A kruhu.

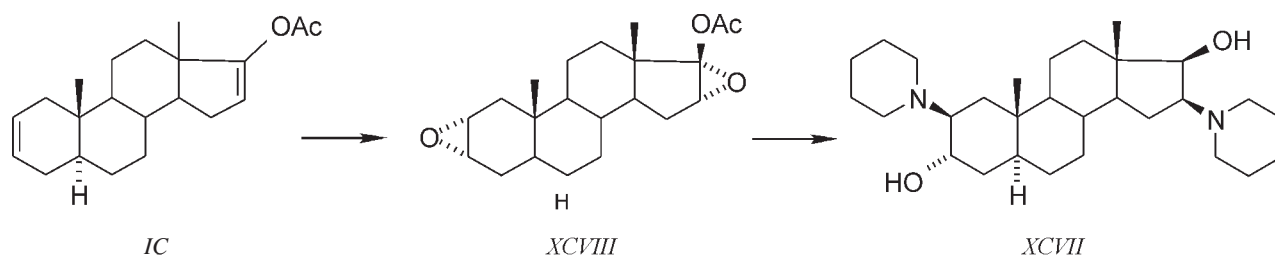
Tetrahydropyranoderivát LXXXIX se ukázal být silnějším antiandrogenem než cyproteronacetát (LX). Je to vlastně první zástupce heterocyklických steroidů, mezi nimiž nacházíme řadu aktivních látek. Např. imidazol⁴⁸ XC (obr. 25) je účinný jako inhibitor 5α-reduktasy i jako inhibitor C17-20-lyasy, a tak spojil dva žádoucí účinky v jedné látce. Inhibitory lidské cytochrom C17-20-lyasy (P450_{17α}) jsou schopny intervenovat v procesu oxidace pregnenolonu na DHEA v gonádách i v nadledvinkách; dosud používané P450_{17α} inhibitory jsou



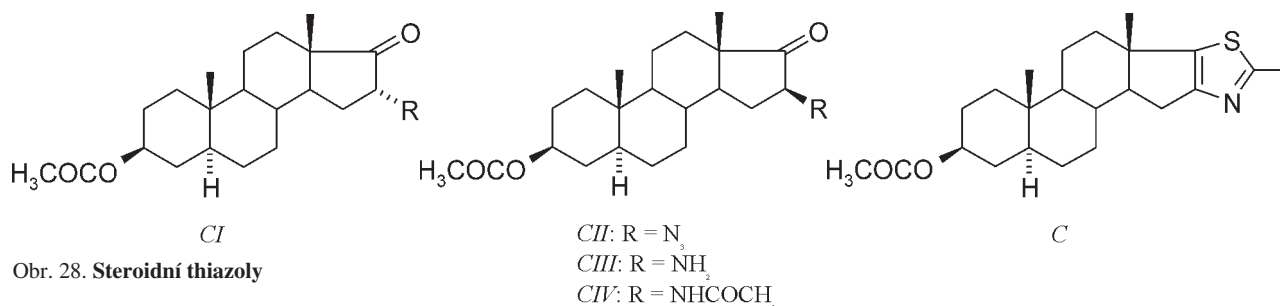
Obr. 25. Imidazolem substituované steroidy



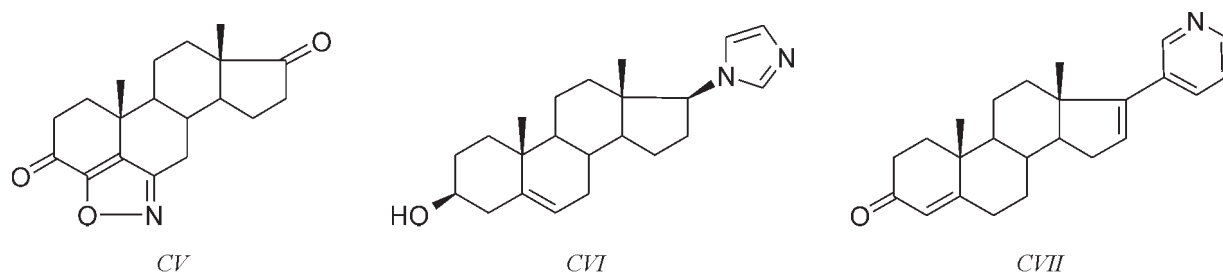
Obr. 26. Heterocyklické analogy steroidních hormonů



Obr. 27. Cesta k pipekuroniu



Obr. 28. Steroidní thiazoly



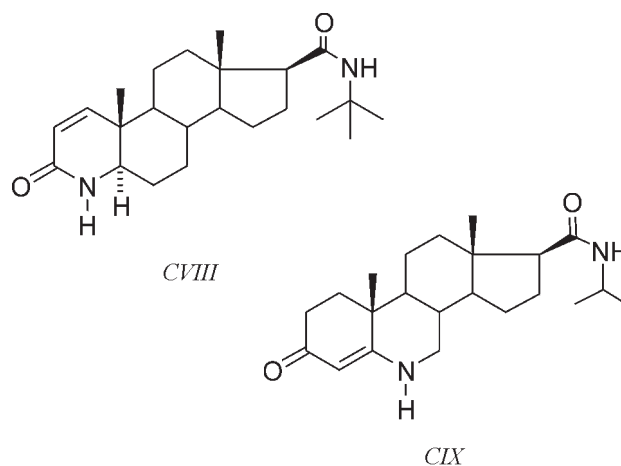
jednak slabé, jednak mají vážné vedlejší účinky. Inhibitory 5 α -reduktasy redukuje testosteron na dihydrotestosteron, jejich působením ale hladina testosteronu v tkáních vzrostla, což u androgen-dependentních nádorů bylo velice nežádoucí. Tyto látky jsou tedy vhodné pro léčbu benigní i maligní hypertrofie prostaty.

Princip syntézy těchto látek je ukázán na jedné z nejúčinnějších, na imidazolu XC. Příprava vychází z 21-acetoxy-20-onu XCI, který reakcí s amoniakem a formaldehydem (za katalýzy octanem měďnatým) poskytuje imidazol XCII, a ten se pak oxiduje v A-kruhu.

Tito autoři připravili ještě další heterocyklické analogy, inhibici 5 α -reduktasy a C17-20-lyasy vykazovaly ještě příslušné pyrazoly (XCIII, X = N, obr. 26) a isoxazoly (XCIV, X = O). Klíčovým stupněm k jejich přípravě je Claisenova kondenzace 20-oxopregnanového derivátu XCV s mravenčanem ethylnatým, při čemž vznikající 21-formylderivát reaguje v enolformě XCVI s hydrazinem nebo hydroxylaminem.

Jiné steroidy kombinované s heterocykly mají dva atomy dusíku ve dvou rozdílných kruzích. Např. pankuroniumbromid (bismethobromid látky XCVII, obr. 27) a jemu podobné látky byly připraveny jako analogy acetylcholinu. To je neurohumorální přenašeč, který je uvolňován z nervových zakončení a je vysoce specificky aktivní ve vyvolání svalových stahů. Pankuroniumbromid se váže na receptory acetylcho-

linu, a tím blokuje svalové stahy. Tyto látky jsou dnes používány^{49,50} při operacích v celkové anestezii jako myorelaxans místo dříve používaného (+)-tubokurarinu. Uvedená báze XCVII byla získána reakcí epoxidu XCVIII s piperidinem za vyšší teploty v autoklávu, výchozí diepoxid XCVIII byl připraven z enolacetátu IC.

Obr. 29. Inhibitory 5 α -reduktasy s heteroatomem v jádře

Podobný cíl sledují další heterocyklické steroidy⁵¹. Kvarterní amoniové sole odvozené od thiazolu *C* (obr. 28), zvláště soli s objemným substituentem na dusíku mají vysokou afinitu k M-2 muskarinovému receptoru. Jejich syntéza byla založena na bromaci příslušného 17-ketonu *Cla* (R = H) do polohy 16 α , solvolýze bromketonu *Cib* (R = Br) působením azidu sodného s inverzí na 16 β -azid *CII*, redukci chloridem cínatým na aminoketon *CIII*, acetylaci a cyklizaci acetátu *CIV* působením siřníku fosforečného.

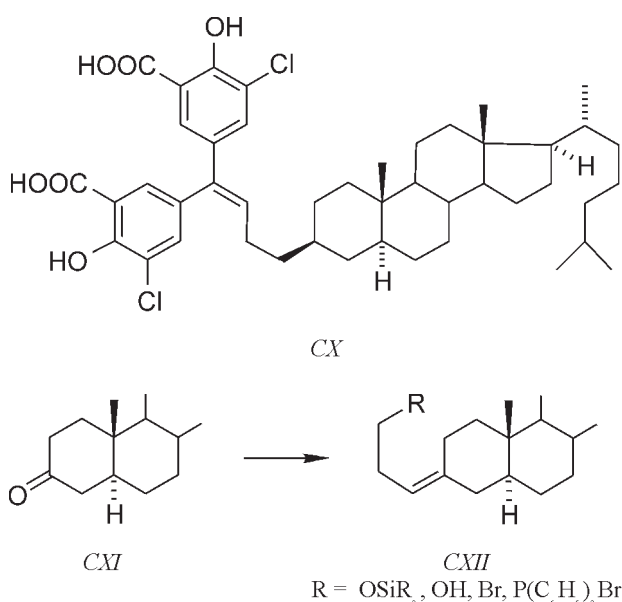
I další steroidy s dusíkatým heterocyklem v molekule se ukázaly být užitečné. Vždy šlo o látky, které se shodovaly s aktivní látkou jen v jedné části molekuly. Tak isoxazol *CV* je inhibitorem aromatasy (CYP 19), zatímco imidazol v poloze 17 (látko *CVI*) je inhibitorem C17 α -hydroxylasy-C17,20-lyasy. Podobnou aktivitu měl i derivát pyridinu *CVII*.

Úspěch heterocykly substituovaných steroidů byl inspirací k dalším modifikacím, tentokrát přímo steroidního jádra. Byla připravena řada různých oxa- a azasteroidních skeletů s heteroatomem v nejrůznějších pozicích. Zajímavá je historie 4-azasteroidu *CVIII* (obr. 29). Firma Merck v osmdesátých letech „racionalizovala“ pracovní místa ve výzkumu a s předpokladem útlumu steroidní chemie zredukovala počet steroidních chemiků ve vývojovém oddělení z dvaceti na jednoho. Po letech tento poslední mohykán připravil sloučeninu, kterou se Merck chlubil dodnes: Finasterid (*CVIII*) byl silným inhibitorem obou izozymů 5 α -reduktasy⁵² a tedy účinným lékem při benigní hyperplazii prostaty (pro finalizaci patentu ale firma musela znova najmout asi dvacet chemiků a vychovat z nich nové sterináře).

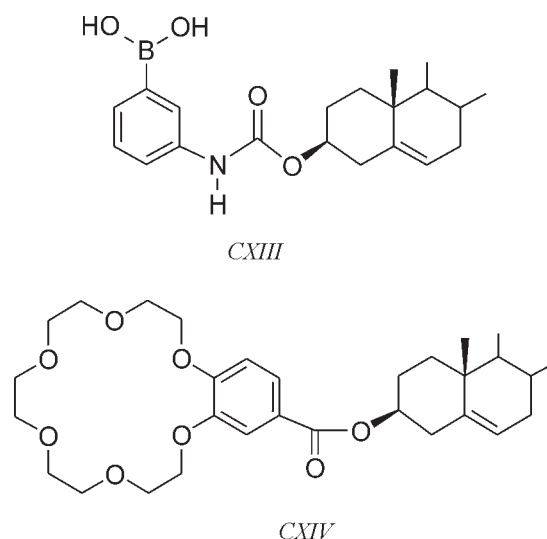
Jiný derivát s heteroatomem v kruhu (*CIX*) má stejné *in vitro* vlastnosti, navíc ještě v nadledvinkách inhibuje účinek 3 β -hydroxy- Δ^5 -steroidní dehydrogenasy a 3-keto- Δ^5 -steroidní isomerasy, která katalyzuje oxidaci např. androstendiolu na testosteron.

7. Syntéza sloučenin obsahujících steroidní molekulu jako stavební blok

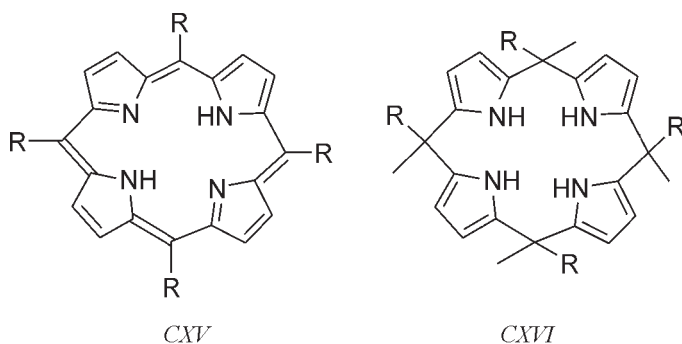
Ještě jedna skupina biologicky aktivních látek, jejichž součástí je steroidní složka, byla v poslední době intenzivně studována. Jejím představitelem je např. kosalan (*CX*, obr. 30). Je to silný antivirový prostředek, který mimo jiné inhibuje replikaci HIV viru typu 1 a 2. Zdá se, že mechanismus tohoto účinku je několikery⁵³. Látka byla připravena z cholestanonu (*CXI*) Wittigovou reakcí, chráněná hydroxylová skupina v lát-



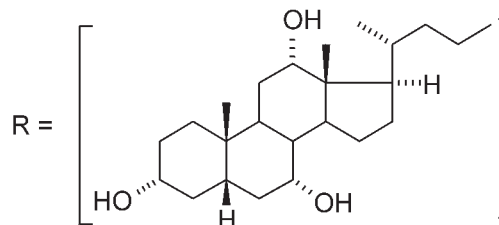
Obr. 30. Kosalan (*CX*) a jeho syntéza

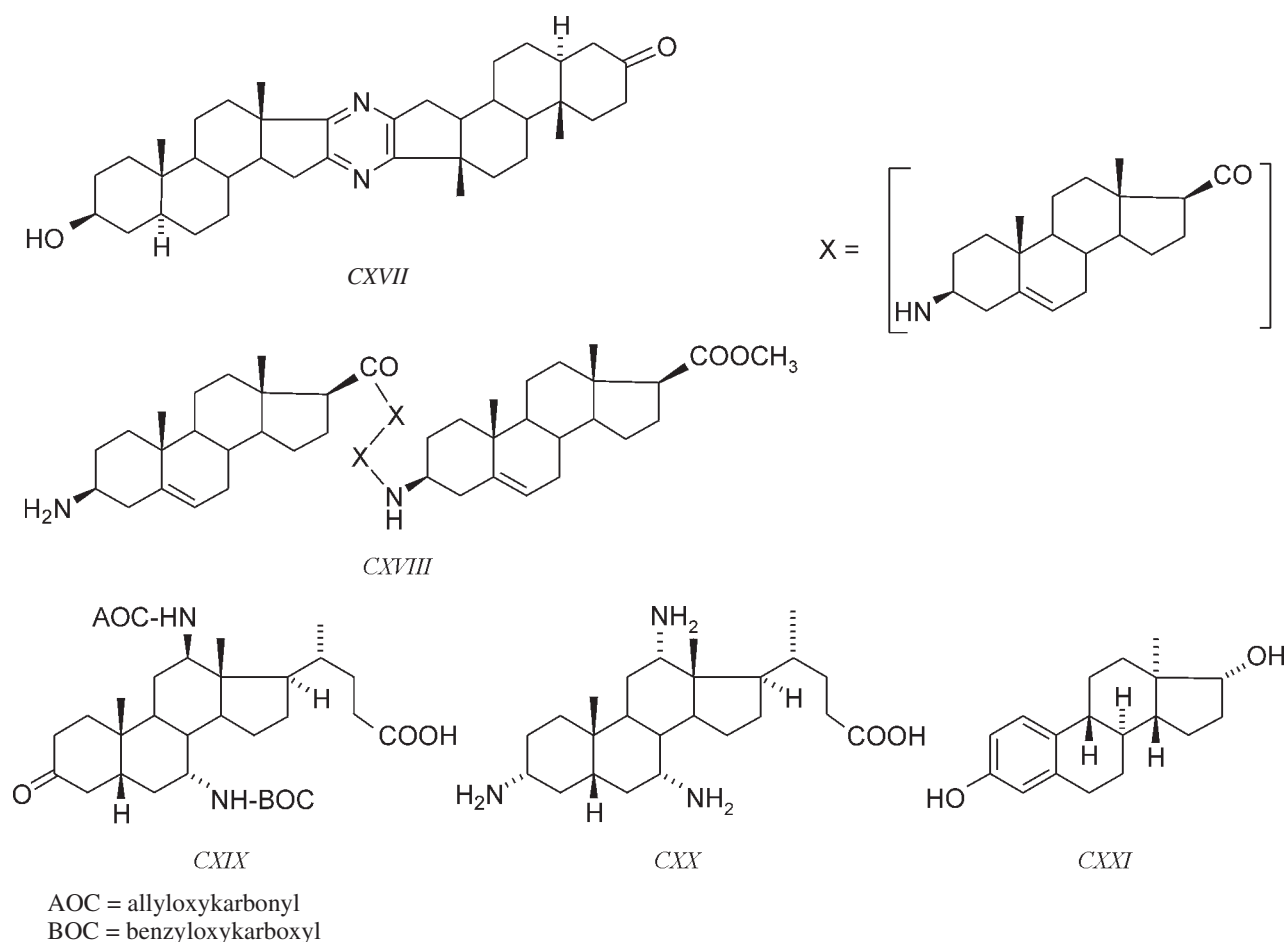


Obr. 31. Cholesterol jako chirální substituent



Obr. 32. Steroidní molekula jako modifikující substituent porfyru





ce *CXIIa* ($R = \text{OSiR}_3$) byla uvolněna, alkohol *CXIIb* ($R = \text{OH}$) byl převeden na bromid *CXIIc* ($R = \text{Br}$) a kvarternizován působením trifenyfosfinu na *CXIId* ($R = \text{P}(\text{C}_6\text{H}_5)_3\text{Br}$). Pro další Wittigovu reakci byl pak použit vhodně substituovaný benzofenon.

V těchto látkách je cholestanový zbytek zřejmě biogením lipofilním zbytkem, který usnadňuje interakci s membránou. V této souvislosti se mluví o cholestanovém zbytku v molekule jako o „lymphotropic vector“. Látek konstruovaných s podobnými představami bylo připraveno víc a měnily se jen farmakofory (např. *N,N*-bis(2-chloroethyl)-*N*-nitrosomočovina⁵⁴ při přípravě nového cytostatika).

Je třeba si uvědomit, že cholestanová část je nejen rigidním alifatickým zbytkem, ale že je i chirální složkou. Toho využili různí autoři, např. při konstrukci sloučenin umožňujících rozpoznání chiralit. Např. látka *CXIII* (obr. 31) umožní rozlišovat jednotlivé monosacharidy. Jedna až dvě molekuly této látky se vážou s jednou molekulou sacharidu a maxima reflexe se posouvají k vyšší či nižší vlnové délce způsobem pro daný sacharid charakteristickým⁵⁵. Látka *CXIV* byla schopna v kyselém prostředí komplexovat chirální kationty, např. aminokyseliny.

Podobné využití chirálních steroidních bloků slibují konjugáty steroidů s porfyrinem, které byly připraveny⁵⁶ z aldehydů odvozených od chráněných derivátů kyseliny cholové kondenzací s pyrrolem. Reakce byla prováděna v dichlorme-

thanu za katalýzy $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$. Např. látka *CXV* (obr. 32), molekula s 12 hydroxylovými skupinami, fungovala jako receptor oligosacharidů s komplexační konstantou $10^4 \cdot \text{mol}^{-1}$. Podobně – za kyselé katalýzy vznikají kalixpyrroly typu *CXVI*, které se selektivně komplexují s některými kyselinami, jako je např. kyselina vinná.

Rigidita a chiralita – tyto dvě základní charakteristiky steroidů – byly v pozadí dalších syntéz, které stavěly výšmolekulární produkty z vhodných steroidních substrátů. Tak jako je v ritterazinu základní jednotkou diazin tvořený dvěma steroidními jednotkami, tak byly vybudovány^{57,58} látky se dvěma až čtyřmi jednotkami typu *CXVII* a *CXVIII*, které jsou studovány jako modulátory buněčných membrán, schopné zprostředkovat přenos iontů přes membránu.

Jiný případ, kdy steroidní sloučenina byla použita jako rigidní chirální stavební blok, byla příprava „scaffold“ pro přípravu nepeptidových knihoven metodami kombinatorní chemie využívající syntézy na pevné fázi. V tomto případě byla kyselina cholová (*Xa*, $R = \text{H}$) postupně přeměněna⁵⁹ v selektivně chráněný derivát 3-oxo-7 α ,12 β -diamino-5 β -cholanové kyseliny *CXIX*. Výchozí kyselina cholová byla díky rozdílným vlastnostem všech tří hydroxylových skupin postupně chráněna v poloze 3, oxidována v poloze 7 a příslušný oxim byl redukován na 7 α -aminoskupinu. Ta byla chráněna acylací, a pak byla hydroxylová skupina v poloze 12 oxidována a přes oxim opět převedena na příslušný amin, který

byl chráněn jinou acylovou skupinou. Látka CXIX byla prostřednictvím karboxylové skupiny v postranním řetězci navázána na polymerní nosič, na němž pak byly jednotlivé skupiny v polohách 3, 7 a 12 selektivně uvolňovány a postupně randomizovaně acylovány. Podobná látka CXX byla připravena podobným způsobem a nazvána „amfifilem“: z α -strany steroidní molekuly totiž ční silně polární aminoskupiny, zatímco β -strana je zcela nepolární. Tato látka byla studována v souvislosti s možností přenosu aniontů přes membránu.

8. Závěr

V Praze byly studovány steroidy už před 120 lety⁶⁰ a naskytá se otázka, zda steroidní chemie už nevstoupila do závěrečné etapy své existence. Dozorčí rady některých velkých farmaceutických společností mají k tomuto názoru blízko, vždyť na současných steroidních produktech už vydělávají dost, proč tedy přinášet na trh nové preparáty, které by se musely draze prosazovat na trhu? Výzkumníci ale vědí, že enantiomery přírodních látek mají někdy vlastnosti zcela nečekané: např. estradiol⁶¹ vykazuje hormonální vlastnosti v gonádách a neuroprotektivní účinky v mozku, ale jeho enantiomer CXXI funguje jen v mozku, což umožňuje separaci obou aktivit. Zdá se tedy, že vše, co bylo dosud v oblasti biologicky aktivních steroidů vykonáno, bude muset být ještě zopakováno za *Alenčíným zrcadlem*.

LITERATURA

- Černý V., v knize: *Chemie přírodních látek*, sv. 8, str. 82. Edice Macro N-8, Praha 1982.
- Wanyonyia A. W., Chhabra S. C., Mkojib G., Eilert U., Njuea W. M.: *Phytochemistry* 59, 79 (2002).
- Cragg G. M., Newman D. J., Snader K. M.: *J. Nat. Prod.* 60, 52 (1997).
- He H., Kulanthavel P., Baker J. J., Kalter K., Dorges J., Cafield D., Wolff L., Adam L.: *Tetrahedron* 51, 51 (1995).
- Morzycki J. W., Gryszkiewicz A.: *Pol. J. Chem.* 75, 983 (2001).
- Siesking O., Kintzinger J. P., Metz B., Albrecht P.: *Tetrahedron* 51, 2009 (1995).
- Sala G. D., Izzo I., Riccardis F. D., Sodano G.: *Tetrahedron Lett.* 39, 4741 (1998).
- Jones S. R., Selinsky B. S., Rao M. N., Zhang X., Iinney W. A., Tham F. S.: *J. Org. Chem.* 63, 3786 (1997).
- Zhang X., Rao M. N., Jones S. R., Feibush R., McGuigan M., Tzodikov N., Feibush B., Sharkansky I., Snyder B., Mallis L. M., Sarkahian A., Wilder S., Turse J. E., Kinney W. A., Kjaerdsgaard H. J., Michalak R. S.: *J. Org. Chem.* 63, 8599 (1997).
- Alexander D. L., Fisher J. F.: *Steroids* 60, 290 (1995).
- Kurosawa T., Nomura Y., Mahara R., Yoshimura T., Kimura A., Ikegawa S., Tohma M.: *Chem. Pharm. Bull.* 43, 1551 (1995).
- Pouzar V., Slavíková T., Černý I.: *Steroids* 63, 454 (1998).
- Garcia-Segura L. M., Azcoitia I., DonCarlos L. L.: *Prog. Neurobiol.* 63, 29 (2001).
- Dicko A., Morissette M., Ben Armeur S., Pézolet M., Di Paolo T.: *Brain Res. Bull.* 49, 401 (1999).
- Ruenitz P. C.: *Curr. Med. Chem.* 2, 791 (1995).
- Bieber E. J., Barnes R. B.: *Int. J. Fertil. Womens Med.* 46, 73 (2001).
- Baracat E., Haidar M., Lopez F. J., Pickar J., Deu M., Negro-Vilar A.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84, 2020 (1999).
- Genazzani A. R., Benedekjasmann L. J., Hart D. M., Andolsek L., Kicovic P. M., Tax L.: *Maturitas* 13, 243 (1991).
- Amin D., Cornell S. A., Gustafson S. K., Needle S. J., Ullrich J. W., Bilder G. E., Perrone M. H.: *J. Lipid Res.* 33, 1657 (1992).
- Weber K. S., Setchell K. D. R., Stocco D. M., Lephart E. D.: *J. Endocrinol.* 170, 591 (2001).
- Gill-Sharma M. K., D'Souza S., Padwal V., Balasinar N., Aleem M., Parte P., Juneja H. S.: *J. Endocrinol. Invest.* 24, 598 (2001).
- Pols H., Eastell R., Delmas P., Adachi J., Ensrud K., Harper K., Sarkar S., Gennari C., Reginster J. Y., Recker R., Harris S., Wu W., Black D., Genant H.: *Bone* 28, Suppl. 85 (2001).
- Hampl R., Lapčík O., Hill M., Klak J., Kasal A., Nováček A., Sterzl I., Sterzl J., Stárka L.: *Physiol. Res. (Prague)* 49, Suppl. 1 107 (2000).
- Brzozowski A. M., Pike A. C. W., Dauter Z., Hubbard R. E., Bonn T., Engstrom O., Ohman L., Greene G. L., Gustafsson J.-A., Carlquist M.: *Nature* 389, 753 (1997).
- Lieberman S.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 774, 1 (1995).
- Marmorston J., Griffith G. C., Geller P. J., Fishman E. L., Welsch F., Weiner J. M.: *J. Am. Geriatr. Soc.* 23, 481 (1975).
- Bobyleva V., Paziienza L., Muscatello U., Kneer N., Lardy H.: *Arch. Biochem. Biophys.* 380, 367 (2000).
- Šulcová J., Hill M., Mašek Z., Česká R., Nováček A., Hampl R., Stárka L.: *Physiol. Res. (Prague)* 50, 9 (2001).
- Shi J., Schulze S., Lardy H. A.: *Steroids* 65, 124 (2000).
- Pahlavani M. A.: *Age (Chester, Pa)* 21, 153 (1998).
- Liu D., Dillon J. S.: *J. Biol. Chem.* 277, 21379 (2002).
- Savic I., Berglund H., Gulyas B., Roland P.: *Neuron* 31, 661 (2001).
- Moriarty R. M., Enache L. A., Kinney W. A., Allen C. S., Canary J. W., Tuladhar S. M., Guo L. A.: *Tetrahedron Lett.* 36, 5139 (1995).
- Wang Z. Q., Cushman M.: *Synth. Commun.* 28, 4431 (1998).
- Reese P. B.: *Steroids* 66, 481 (2001).
- La Cour T. G., Guo C., Bhandaru S., Boyd M. R., Fuchs P. L.: *J. Am. Chem. Soc.* 120, 692 (1998).
- LaCour T. G., Guo C., Boyd M. R., Fuchs P. L.: *Org. Lett.* 2, 33 (2000).
- Kumar N., Koida S. S., Tsong Y. Y., Sundaram K.: *Steroids* 65, 629 (2000).
- Grove M. D., Spencer G. F., Rohwedder W. K., Mandava N., Worley J. F., Warthen J. D., Jr., Steffens G. L., Flippen-Anderson J. L., Cook J. C., Jr.: *Nature* 281, 216 (1979).
- Dinan L., Harmatha J., Lafont R.: *J. Chromatogr., B* 935, 105 (2001).

41. Kohout L., Strnad M., Kamínek M.: ACS Symp. Ser. 474, 56 (1991).
42. Černý V., Buděšínský M.: Collect. Czech. Chem. Commun. 55, 2738 (1990).
43. Back T., Baron D. L., Luo W., Nakajima S. K.: J. Org. Chem. 62, 1179 (1997).
44. Blazejewski J.-C., Guilhem J., Le Guyader F.: J. Chem. Soc., Perkin Trans 1 1997, 1913.
45. Stárka L., Hampl R., Kasal A., Kohout L.: J. Steroid Biochem. 17, 331 (1982).
46. Hu Y., Sherwin P. F., Covey D. F.: Steroids 60, 250 (1995).
47. Kasal A., Hampl R., Bičíková M., Stárka L.: Steroids 57, 460 (1992).
48. Ling Y. Z., Li J. S., Liu Y., Kato K., Klus G. T., Brodie A.: J. Med. Chem. 40, 3297 (1997).
49. Sato K., Windisch K., Matko I., Vizi E. S.: Br. J. Anaesth. 82, 904 (1999).
50. Lowenick C. V., Krampfl K., Schneck H., Kochs E., Bufler J.: Eur. J. Pharmacol. 413, 31 (2001).
51. Urbanský M., Proška J., Drašar P.: Collect. Czech. Chem. Commun. 64, 1457 (1999).
52. Frye S. V.: Curr. Pharm. Design 2, 59 (1996).
53. Paul G. C., De Clercq E., Pannecouque C., Witvrouw M., Loftus T. L., Turpin J. A., Buckheit R. W., Cushman M.: Bioorg. Med. Chem. Lett. 10, 2149 (2000).
54. Elkihel L., Gelin M., Letourneux Y.: Drug Res. 45, 190 (1995).
55. James T. D., Kawabata H., Ludwig R., Murata K., Shin-kai S.: Tetrahedron 51, 555 (1995).
56. Dukh M., Drašar P., Černý I., Pouzar V., Shriver J. A., Král V., Sessler J. L.: Supramol. Chem. 14, 237 (2002).
57. Černý I., Pouzar V., Buděšínský M., Drašar P.: Collect. Czech. Chem. Commun. 65, 1597 (2000).
58. Černý I., Buděšínský M., Pouzar V., Drašar P.: Collect. Czech. Chem. Commun. 66, 933 (2001).
59. Kasal A., Kohout L., Lebl M.: Collect. Czech. Chem. Commun. 60, 2147 (1995).
60. Reinitzer F.: Monatsh. Chem. 9, 421 (1888).
61. Green P. S., Yang S. H., Nilsson K. R., Kumar A. S., Covey D. F., Simpkins J. W.: Endocrinology 142, 400 (2001).

A. Kasal (*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*):
Steroids at the Beginning of the 21st Century

The review is based on a short lecture, presented to post-graduate students of chemistry. Emphasis was laid on trends of steroid chemistry at the turn of the century. The steroid nomenclature is briefly reviewed with respect to the names frequently used in literature, in which mainly medical authors prefer historical names. Several types of new natural steroids are given. Biological activity of isolated steroids or their synthesised analogues is the major impetus in modern steroid chemistry. The future prospect of steroid chemistry is bright considering the fact that unnatural enantiomers usually have a different activity from that of their natural counterparts. This suggests a repetition of the whole steroid chemistry behind Alice's looking glass.

GIBERELINY, NAKIENONY A INKRUSTOPORINY: RADOSTI A STRASTI SYNTÉZ MALÝCH, VYSOCE FUNKCIONALIZOVANÝCH MOLEKUL

MILAN POUR

Katedra anorganické a organické chemie, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové
e-mail: pour@faf.cuni.cz

Došlo 5.9.02, přepracováno 26.3.03, přijato 18.4.03.

Klíčová slova: přírodní látky, rostlinné hormony, syntéza, biologická aktivita, analogy (–)inkrustoporinu, gibereliny, antheridiogeny, nakienony A a B

Obsah

1. Úvod
2. Gibereliny a antheridiogeny: chemická regulace vývojového cyklu rostlin
 - 2.1. Syntéza 11-hydroxy-9,15-cyklogiberelinů
 - 2.2. Vývoj syntézy 12-hydroxy-9,15-cyklogiberelinů
3. Totální syntéza nakienonů A a B
4. Syntéza analog (–)inkrustoporinu
5. Závěr

1. Úvod

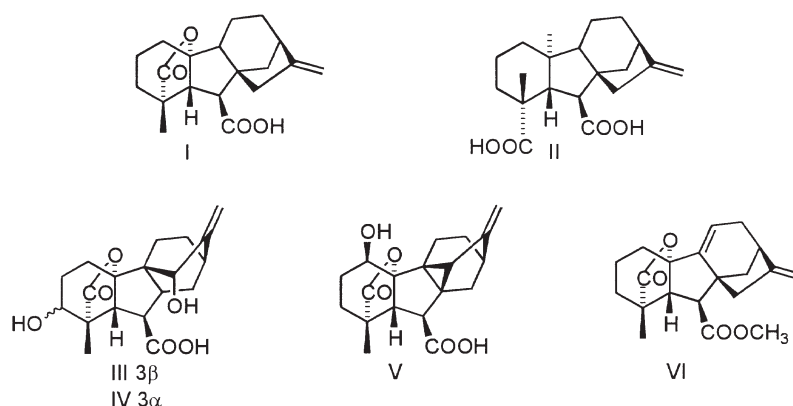
Živé organismy byly a stále jsou bohatým zdrojem organických látek s unikátní molekulární architekturou a zajímavými biologickými vlastnostmi. Každý objev nové přírodní látky vyžaduje rigorózní důkaz její struktury, který je v řadě případů možný pouze na základě syntézy, a zjištění biologických vlastností, stojících za hlubší prozkoumání, rovněž vede k nutnosti danou substanci připravit, pokud možno tak,

aby navržená cesta umožnila i syntézu co největšího množství analogů. Cílem následujícího pojednání je provést čtenáře souhrnem myšlenkových koncepcí a nejdůležitějších výsledků syntetických studií na několika typech přírodních látek, za které byla udělena cena Alfreda Badera v roce 2001.

2. Gibereliny a antheridiogeny: chemická regulace vývojového cyklu rostlin

Různé fáze vývoje vyšších rostlin, jako je např. klíčení semen, přerušení vegetačního klidu, syntéza enzymů, indukce růstu stonku, stimulace kvetení, parthenokarpický vývoj plodů, zvětšení jejich velikosti a zpomalení procesu stárnutí jsou mj. regulovány skupinou hormonů, které jsou označovány jako gibereliny¹. Jedná se o více než sto vysoce funkcionalizovaných diterpenoidů, které jsou hojně rozšířeny ve vyšších rostlinách. Základní struktura *ent*-20-norgiberelanu je stejná pro ca 60 metabolitů, za jejichž mateřskou strukturu lze považovat giberelin A₉ (*I*, GA₉). Jednotlivé látky se liší zejména polohou OH skupin (obsahují až čtyři OH skupiny), přítomností další dvojné vazby, epoxidové skupiny, oxoskupiny nebo karboxylové skupiny². Většina zbývajících giberelinů obsahuje úplný skelet *ent*-giberelanu o 20 uhlíkových atomech, který odráží jejich biosyntetický původ z geranylgeranyl pyrofosfátu. Mateřská sloučenina je GA₁₂ (*II*), a další strukturální variace zahrnují různý stupeň oxidace na C(20) nebo přítomnost dalších OH skupin (obr. 1). Podrobnější informace o chemii, biologii a aplikacích těchto látek lze nalézt v souhrnném referátu², který publikoval Mander v r. 1992.

V roce 1950 Döpp prokázal^{3,4}, že tvorbu samčích pohlavních orgánů (antheridií) na nezralých gametofytech druhů *Pteridium aquilinum* (hasivka orličí) a *Dryopteris filix-mas* (kaprad samec) bylo možno vyvolat substancí, která byla izolována z dospělých gametofytů. Po tomto objevu bylo



Obr. 1. Strukturální typy giberelinů a antheridiogenů

izolováno několik dalších sloučenin z jiných druhů kapradin⁵ a byl pro ně vytvořen název antheridiogeny. Základním vodítkem při určení struktury těchto látek bylo pozorování, že u některých druhů čeledi *Schizaeaceae* tyto látky projevovaly biologickou aktivitu podobnou giberelinům⁶ a naopak, že gibereliny rovněž urychlovaly tvorbu antheridií^{7,8}. Nakanishi a kol. využili tyto informace pro určení struktury⁹ (III) antheridové kyseliny¹⁰, nejdůležitějšího antheridiogenu z *Anemia phyllitidis*. Tato struktura byla později revidována (na IV) díky totální syntéze, kterou provedli Corey a Myers¹¹. Přítomnost antheridové kyseliny byla dokázána v dalších druzích rodu *Anemia*, konkrétně v *A. hirsuta*¹², *A. rotundifolia* a *A. flexuosa*¹³. Nebyla objevena v *A. mexicana*, ale z tohoto druhu byl získán jiný, giberelinům podobný antheridiogen¹⁴, pro který byla navržena struktura¹⁵ V, a potvrzena syntézou¹⁶ z giberelinu A₇. Struktury dvou antheridiogenů, izolovaných z příbuzného druhu *Lygodium japonicum*, byly rovněž zkoumány, přičemž účinnějším z nich je methylester 9,11-didehydro-GA₉ (VI)^{17,18}. Antheridiogeny obecně indukují tvorbu antheridií už v koncentracích 10⁻¹⁴ M a také iniciují klíčení spór, i když v relativně vyšších koncentracích (10⁻¹¹–10⁻¹⁰ M)¹⁹.

Koncentrace hormonů v rostlinném materiálu se běžně pohybuje v řádu mikrogramů až nanogramů na kilogram. Získání dostatečného množství čistých látek proto zpravidla představuje značnou časovou a finanční zátěž. Např. k získání 38 mg GA₃₂ bylo nutné zpracovat jádra z 1 tuny nezralých broskví^{20,21} a pouhých 14 mg GA₁₉ bylo získáno ze 44 tun bambusových výhonků²². V řadě případů je z praktického hlediska možné získat jen nanogramová množství, která nám dovolují pouze hrubý odhad struktury na základě hmotnostního spektra a chromatografického chování. V hmotnostních spektrech giberelinů a antheridiogenů existuje řada charakteristických iontů či úbytků hmotnosti, které lze přiřadit určitým izolovaným strukturám, ale kombinace několika těchto strukturálních elementů v jedné molekule často vede k potlačení diagnostických fragmentací. Po získání první představy o struktuře je tak dalším krokem její potvrzení nebo vyvrácení částečnou syntézou.

2.1. Syntéza 11-hydroxy-9,15-cyklogiberelinů

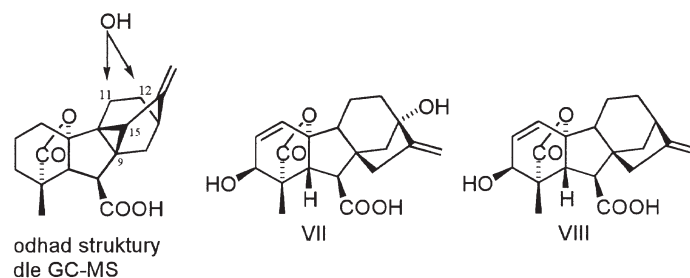
Na počátku 90. let minulého století izolovali Yamane a jeho skupina na univerzitě v Tokiu několik dosud nepopsaných hormonů a strukturně příbuzných metabolitů z výše popsáných skupin, kterým byly přisouzeny následující strukturální rysy: 1. poloha hydroxylové skupiny na uhlíku č. 11 nebo 12 v kruhu C, 2. skelet založený na struktuře 9,15-cyklogiberelinu A₉ s cyklopropanovým kruhem (obr. 2). Ze syntetického

hlediska patří polohy 11 a 12 mezi nejobtížněji dostupné, neboť v kruhu C komerčně dostupných derivátů, používaných jako výchozí látky (*vide infra*), nejsou žádné funkční skupiny, kterých by bylo možno využít. Byly známy následující operace²: 1. zavedení substituentu do polohy 11 u giberelinů a 9,15-cyklogiberelinů, 2. zavedení substituentu do polohy 12 giberelinového skeletu. Těchto metod bylo pouze několik a byly do té doby použity jen v omezeném počtu případů. Postup, který by spolehlivě umožnil provést substituci do polohy 12 u 9,15-cyklogiberelinového systému, neexistoval. Cílem syntetického programu, jehož hlavní výsledky jsou dále popsány, byl důkaz struktury výše popsáných látek na základě jejich syntézy. Ten předpokládal aplikaci a další vývoj několika existujících syntetických postupů, a dále vývoj co nejobecnější syntetické cesty pro hydroxylaci 9,15-cyklogiberelinového skeletu do polohy 12.

Pro syntézu giberelinů a antheridiogenů se dá s výhodou využít komerční dostupnosti dvou derivátů, získávaných fermentací houby *Gibberella fujikuroi*, GA₃ (VII) a GA₇ (VIII) (obr. 2). 3,13-Dihydroxy derivát GA₃ je produkován efektivněji a je proto levnější, zatímco druhý derivát je získáván úpravou fermentačních podmínek ve směsi s analogickým 1,2-dihydro derivátem. Obě látky mají vysoce funkcionalizovaný kruh A (allylový lakton a substituent v poloze 3); jedinou funkční skupinou v oblasti kruhů C a D je exocyklická dvojná vazba v poloze 16. Z hlediska struktury možných výchozích materiálů tak v principu existují 3 základní strategie pro zavedení funkčních skupin do kruhu C giberelinů:

1. využití funkčních skupin v kruhu A pro postupnou funkcionalizaci dalších poloh až do kruhu C,
2. transanulární proces s využitím substituentů v kruhu D,
3. rozštěpení vazby mezi C(13) a C(16) a rekonstrukce kruhu D v pozdějším stadiu.

Při syntéze derivátů 11-hydroxy-9,15-cyklogiberelinového typu (obr. 3) bylo využito allylového laktonu v kruhu A pro funkcionalizaci polohy 11 a vzájemné souhry substituentů v kruzích A a C pro tvorbu vazby mezi uhlíky 9 a 15 (zavedení cyklopropanového kruhu). Výchozím materiálem byl GA₇ (VIII), jenž byl po ochránění hydroxylové a karboxylové funkce podroben přesmyku působením ZnBr₂ na izomerní 19,2-lakton a exocyklická dvojná vazba v kruhu D byla odstraněna ozonolýzou za vzniku meziproductu IX. Allylová bromace této látky poskytla přímo dibromderivát X; v reakční směsi bylo možné pozorovat vznikající monobromderivát, ale jeho další bromace do druhé allylové polohy byla tak rychlá, že při použití jednoho ekvivalentu činidla byla vždy izolována směs výchozí látky, monobrom- a dibromderivátu. Přesun dvojně

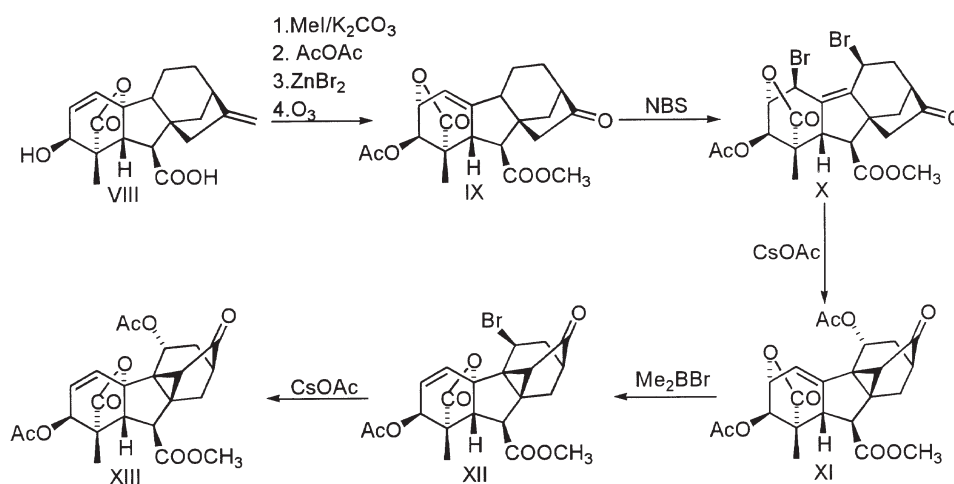


Obr. 2. Předpokládaná struktura nově izolovaných látek a dostupné výchozí materiály

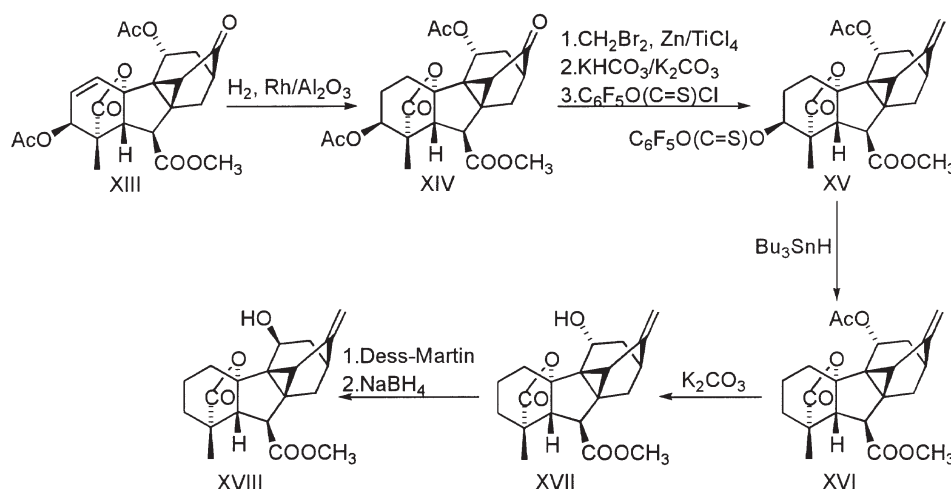
vazby do polohy 10(9) je přirozeně způsoben izomerací původně vzniklého allylového radikálu na stabilnější. Látka *X* byla ideálním kandidátem pro další práci, neboť obsahovala nejen substituent na C(11), ale i další funkce, nutné pro tvorbu vazby C-C mezi uhlíky 9 a 15, tj. enolizovatelný C(15), a dvojnou vazbu v poloze 10(9) s allylovým substituentem na C(1). Následujícími kroky proto byla výměna bromu za kyslíkatou funkci a uzavření cyklopropanu atakem 15,16-enolátu na C(9). Octan cesný v suchém benzenu v přítomnosti ekvivalentního množství 18-crown-etheru umožnil provést obě reakce v jednom kroku za vzniku látky *XI*. Struktura oblasti kruhů C a D ketonu *XI* byla shodná s cílovou látkou, a další operací byla zpětná izomerace 19,2-laktonu na 19,10-lakton. Tato reakce se standardně provádí působením Lewisovy kyseliny, Me_2BBr . Její mechanismus pravděpodobně zahrnuje koordinaci mezi laktonovou funkcí a boranem, po které následuje nukleofilní substituce bromidem na C(2) a celý proces je ukončen intramolekulární allylovou substitucí uvolněnou karboxylátovou skupinou na C(10). Kontratermodyna-

mická podstata této reakce může být do jisté míry vysvětlena předpokladem, že její hnací silou je selektivní komplexace mezi činidlem a 19,2-laktony, které 19,10-laktony v důsledku sterického bránění nepodléhají. Zanedbatelnou, ale přesto komplikací při přesmyku laktonu *XI* byla substituce acetoxylové skupiny na C(11) bromem, takže celkovým výsledkem reakce byla látka *XII*. Nežádoucí reakce byla pravděpodobně způsobena koordinací boranového činidla ke kyslíku acetoxylové skupiny a především aktivací polohy 11 sousedícím cyklopropanovým kruhem. V další reakci byl proto brom na C(11) znova nahrazen acetátem a struktura vzniklého derivátu *XIII* mohla být dále obměňována směrem k cílovým látkám.

Dokončení syntézy je znázorněno na obr. 4. V diacetátu *XIV*, vzniklém hydrogenací látky *XIII*, byla nejprve obnovena exocyklická dvojná vazba pomocí Lombardova-Oshimova protokolu a selektivní hydrolýzou odstraněna acetátová skupina v poloze 3. Uvolněný hydroxyl tak bylo možné jednoduše odstranit radikálovou deoxygenací. I když při radikálové reakci hrozilo větší nebezpečí zničení citlivých funkčních sku-



Obr. 3. Příprava klíčového prekursoru pro syntézu 11-hydroxy-9,15-cyklogiberelinů



Obr. 4. Dokončení syntézy methyl esterů 11 α - a 11 β -hydroxy-9,15-cyklo-GA₉

pin v kruzích C a D, atraktivní možností bylo použití pentafluorenoxythiokarbonylové skupiny, zavedené Bartonem a Jaszberenyim, vzhledem k rychlosti, jakou tyto estery podléhají β -štěpení. Hydroxylová skupina v poloze 3 tak byla esterifikována pentafluorenoxythiokarbonylchloridem za vzniku derivátu XV. Látka XV poskytla při radikálové deoxygenaci tributylcínhydridem derivát XVI v téměř kvantitativním výtěžku (během několika minut!) a syntéza první cílové látky, methylesteru 11 α -hydroxy-9,15-cyklo-GA₉ (XVII), byla dokončena hydrolýzou 11 α -acetátu. Poslední operace, příprava epimerního 11 β -alkoholu, vycházela z předpokladu, že při redukci oxoskupiny na C(11) borohydridem sodným bude hydrid přednostně napadat reakční centrum ze stericky přístupnější α -strany. Alkohol XVII byl proto podroben oxidaci Dessovým-Martinovým činidlem, a následná redukce vzniklého ketonu poskytla směs obou epimerů v poměru 3:1, s 11 β -alkoholem XVIII jako hlavním produktem²³.

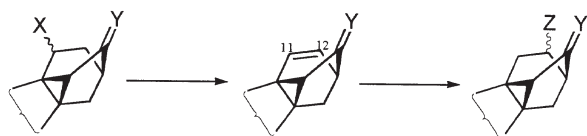
Hmotnostní spektrum a Kovatsův retenční index methylesteru 11 β -OH-9,15-cyklo-GA₉ (XVIII), derivatizovaného trimethylsilylovou skupinou, byly shodné se spektrem a retenčním indexem derivatizované neznámé látky izolované z vy-

vějících se jablečných semen²⁴. Tím bylo potvrzeno, že tato substance je přírodním giberelinem a byla jí přiřazena alokace GA₁₀₈.

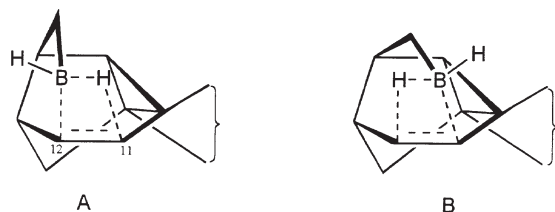
2.2. Vývoj syntézy 12-hydroxy-9,15-cyklogiberelinů

Dostupnost 11-hydroxy-9,15-cyklogiberelinů v gramových množstvích umožnila vytvoření elegantní koncepce syntézy 12-hydroxy izomerů (obr. 5): eliminace substituentu v poloze 11 a následná funkcionalizace takto vytvořené dvojné vazby vhodným činidlem. Vzhledem k polarizaci dvojné vazby, způsobené sousedícím cyklopropanovým kruhem, se dalo předpokládat, že činidlo boranového typu bude atakovat C(12) elektrondeficitním atomem boru, zatímco hydridová část reagentu napadne C(11). Vzniklý intermediát pak po oxidativním zpracování poskytne sloučeninu, hydroxylovanou v poloze 12. Podrobnější rozbor naznačil, že celkovou selektivitu procesu bude možné dále zvýšit použitím exocyklické dvojné vazby v poloze 16 jako stereochemického kontrolního prvku. Boranové činidlo se bude přednostně adovat na lépe přístupnou exocyklickou dvojnou vazbu z méně bráněné *exo*-strany. Skupina BH₂ na C(17) pak bude intramolekulárně atakovat dvojnou vazbu v kruhu C, a tato adice může probíhat přes dva možné tranzitní stavy (obr. 6), přičemž tranzitní stav A se jevil jako výhodnější než tranzitní stav B, jednak vzhledem k výše zmíněné polarizaci dvojné vazby způsobené cyklopropanovým kruhem, a jednak vzhledem k vyššímu pnutí v intermediátu, vznikajícímu přes tranzitní stav B.

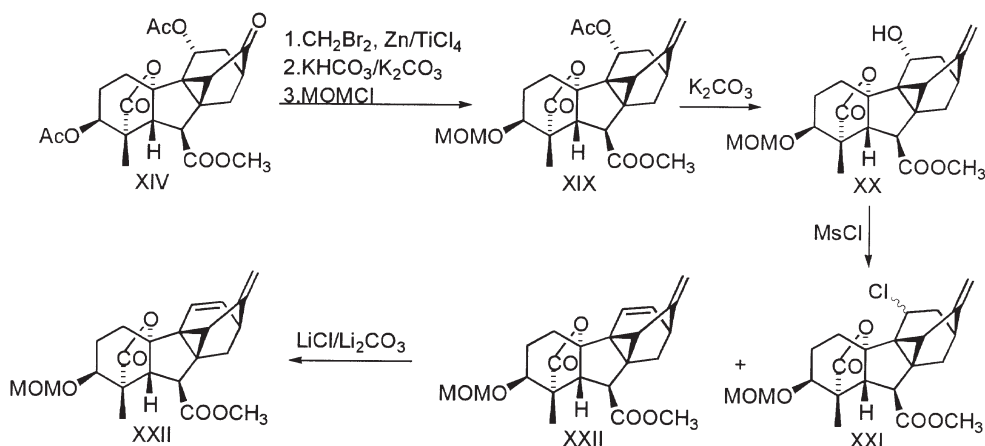
Jako výchozí látka k syntéze byl použit diacetát XIV, který byl k dispozici v množství stovek miligramů (obr. 7). Obnovou exocyklické dvojné vazby, následovanou změnou chránicí skupiny v poloze 3, vznikla látka XIX, ve které byla další hydrolýzou odstraněna zbylá acetátová skupina v poloze 11 za vzniku alkoholu XX. Tento derivát reakcí s methansulfonylchloridem poskytl směs produktu substituce mesyloxy skupiny chlorem (XXI) a požadovaného dienu XXII. Eliminací byl dokončen proces směsi s kombinací chloridu a uhličitanu lithného v DMF a dien XXII byl podroben hydroboraci komplexem boranu a dimethylsulfidu (obr. 8). Oxidativním zpracováním reakční směsi vznikl jako hlavní



Obr. 5. Koncepce syntézy 12-hydroxy-9,15-cyklogiberelinů



Obr. 6. Možné tranzitní stavy pro intramolekulární hydroboraci



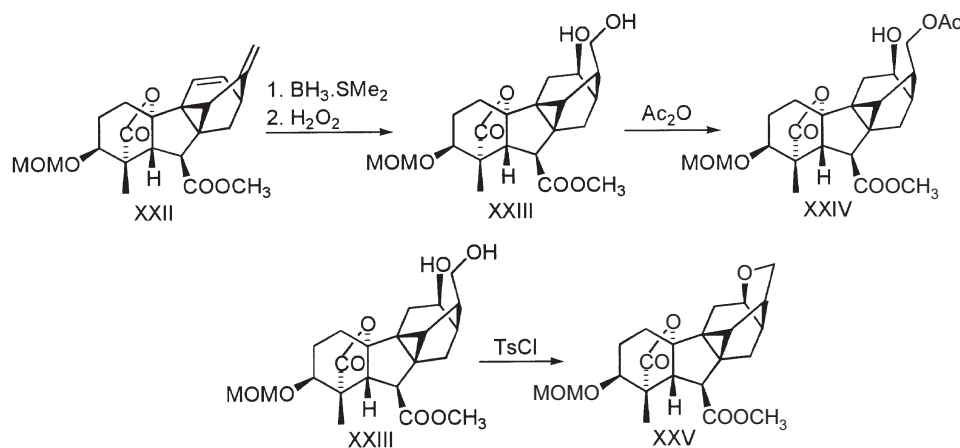
Obr. 7. Syntéza výchozí látky (dien XXII) pro hydroboraci

produkt diol **XXIII**, jehož struktura byla potvrzena NMR spektroskopii, a jehož selektivní acetylaci byl pak získán monoacetát **XXIV**. Rentgenová analýza krystalů látky **XXIV** dokázala její strukturu, a tím i správnost výše zmíněných úvah, které sloužily jako východiska pro strategii syntézy 12-OH-9,15-cyklogiberelinů.

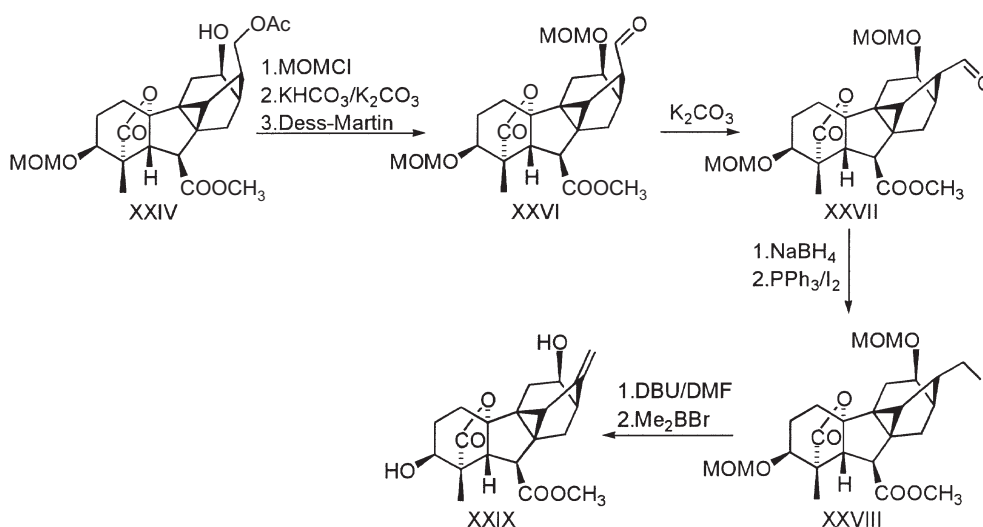
Výsledkem úspěšné hydroborace bylo nejen požadované zavedení OH skupiny na C(12), ale i prostorová blízkost obou nových hydroxylových skupin v polohách 12 β a 17. Ta se projevila participací hydroxylu 12 β při většině dalších transformací primárního hydroxylu v poloze 17, tedy jako komplikující faktor. Např. při konverzi na tosyloxyskupinu nevznikl 17-tosylát, ale 12 β ,17-ether **XXV** (obr. 8), neboť po prvotním vzniku tosylátu došlo k spontánní intramolekulární nukleofilní substituci, a při pokusu o selektivní ochránění primární OH skupiny jako *tert*-butyldimethylsilyletheru byla získána směs výchozí látky, obou mono- a bis(*tert*-butyldimethylsilyl)derivátů. K celé sekvenci proto přibyla další operace (obr. 9), kterou bylo prostorové oddálení obou hydroxy-

lových skupin epimerací 17-aldehydu. 12 β -OH skupina v acetátu **XXIV** byla ochráněna jako methoxymethylether, acetát odstraněn hydrolyzou a uvolněná hydroxylová skupina byla podrobena oxidaci na aldehyd Dessovým-Martinovým činidlem. Vzniklý aldehyd **XXVI** podlehl epimeraci působením uhličitanu draselného na stabilnější *exo*-aldehyd **XXVII**. V látce **XXVII** již nebezpečí participace funkční skupiny na C(12) při obnovování exocyklické dvojné vazby v poloze 16. Aldehydická skupina byla proto zredukována a vzniklý hydroxyl vyměněn za jod za vzniku látky **XXVIII**. Exocyklická dvojná vazba byla obnovena eliminací elementů jodovodíku působením DBU a v posledním kroku byly methoxymethylové chránicí skupiny odstraněny reakcí s Me₂BBr. 3 β ,12 β -Dihydroxyderivát **XXIX** byl tak prvním připraveným 12-hydroxygiberelinem s 9,15-cyklogiberelinovým skeletem.

Takto vyvinutá sekvence rovněž umožnila přípravu zbývajících stereoizomerů s hydroxylovými skupinami v dalších konfiguracích (3 α ,12 β ; 3 β ,12 α ; 3 α ,12 α), jakož i přípravu derivátů deoxygenovaných v poloze 3 (cit.^{25,26}).



Obr. 8. Hydroborace dienu **XXII** a vybrané reakce vzniklého diolu **XXIII**

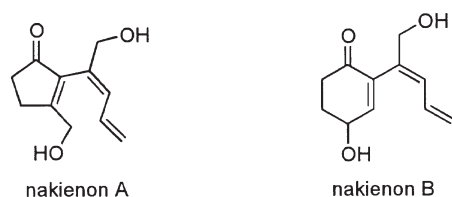


Obr. 9. Dokončení syntézy methyl esteru 3 β ,12 β -dihydroxy-9,15-cyklo-GA₉

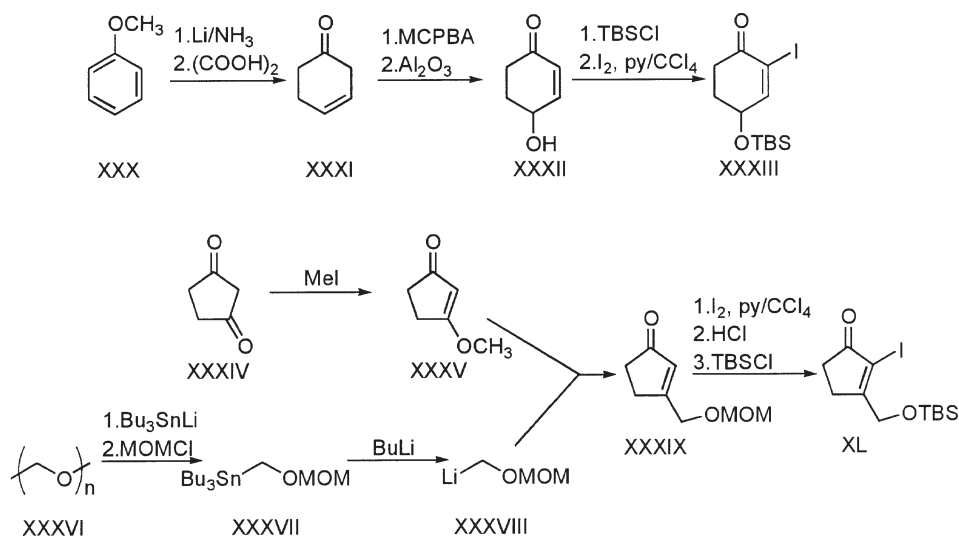
3. Totální syntéza nakienonů A a B

Nakienony A a B (obr. 10) jsou cytotoxické sekundární metabolity, izolované²⁷ spolu s dalšími látkami z nekrotických korálových útesů pokrytých souvislým porostem mikrořasy *Synechocystis* sp. poblíž ostrova Okinawa. Přemnožená řasa způsobila zánik hostitelského korálu, a i když to nebylo jednoznačně prokázáno, je pravděpodobné, že výše zmíněné látky se podílejí na chemické ekologii této interakce. Strukturu nakienonů určili Gerwick a Nagle pomocí 2D NMR experimentů a porovnáním se spektry některých popsanych látek.

Základem struktur nakienonů je cyklus se zabudovanou enonovou funkcí, ke kterému je navázán pentadienylový postranní řetězec, společný oběma látkám. Z přítomnosti konjugovaných dvojných vazeb lze vyúšit citlivost ke kyselinám; u nakienonu A byl také skutečně pozorován kysele katalyzovaný přesmyk už při měření NMR spekter v CDCl_3 . Z toho důvodu bylo žádoucí navrhnout takovou přípravu, která by se, pokud možno, vyhýbala použití kyselého prostředí. Zvolíme-li vazbu C-C mezi postranním řetězcem a cyklickým základem za strategickou, dostaneme jejím rozpojením dva synthony, na které lze v syntetickém smyslu aplikovat proces katalyzovaný palladiem, jehož nejznámější varianty jsou známy jako Suzukiho, Stilleho a Negishiho coupling. Tyto reakce probíhají za podmínek, které mohou být dle provedení mírně bazické až neutrální. Syntéza nakienonu B se tak dále rozkládá na přípravu (Z)-2-jodpenta-2,4-dienolu a 2-jod-4-hydroxycyklohex-2-enonu (podobně pro přípravu nakienonu A lze



Obr. 10. Struktury nakienonů A a B

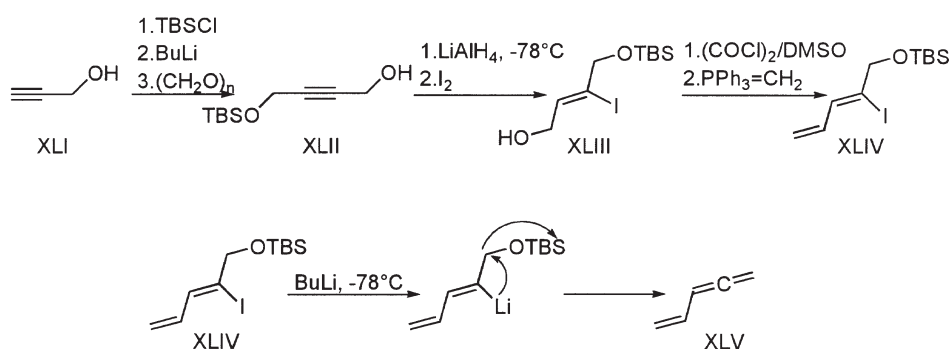


Obr. 11. Syntézy precursorů cyklických základů nakienonů A a B

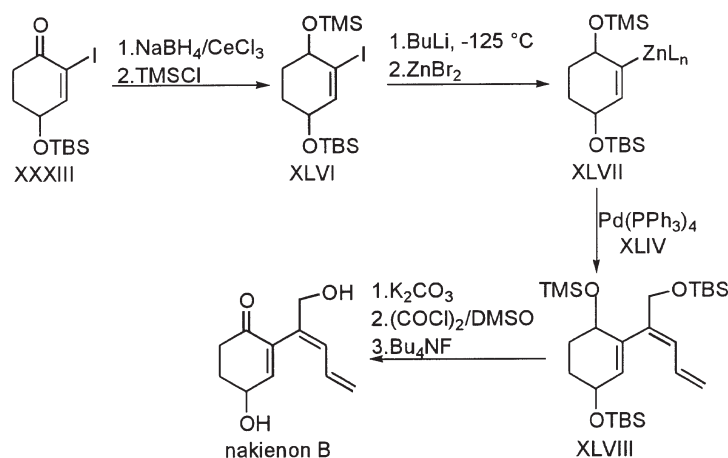
využít první z uvedených látek a 3-hydroxymethylcyklopent-2-enon).

Přípravy cyklických komponent jsou popsány na obr. 11. Příprava šestičlenného jodenonu *XXXIII* využila přímočarý postup, popsáný Danishefským a spolupracovníky: Birchova redukce anisolu a opatrná hydrolyza produktu vedla k cyklohex-3-enonu (*XXXI*), který byl dále převeden na odpovídající epoxid. Ten byl podroben enolizaci na oxidu hlinitém, přičemž ve vzniklém enolátu došlo k fragmentaci tříčlenného kruhu za vzniku 4-hydroxycyklohex-2-enonu (*XXXII*), do jehož α -polohy byl po ochránění OH skupiny zaveden jod. Pětčlenný enon *XL* byl připraven s využitím reaktivity 3-methoxycyklopent-2-enonu (*XXXV*), získaného methylací cyklopent-1,3-dionu. Tato látka při reakci s methoxymethyloxymethylithiem poskytla jako hlavní produkt 3-methoxymethyloxymethylcyklopent-2-enon (*XXXIX*), který byl podroben analogické jodaci jako v předchozím případě a výměně methoxymethylové chránicí skupiny, jenž by mohla svými komplexačními vlastnostmi komplikovat průběh reakcí zahrnujících organokovy, za *tert*-butyldimethylsilylovou.

Syntéza precursoru postranního řetězce, jododienu *XLIV*, vycházela z propargylalkoholu jako výchozího materiálu (obr. 12). Hydroxylová skupina byla ochráněna jako TBS-ether a po následné sekvenci deprotonace/reakce s paraformaldehydem vznikl derivát but-2-in-1,4-diolu *XLII*. Látka *XLII* byla podrobena hydroaluminaci hydridem hlinitolihným, jejíž regioselektivní průběh je za nízké teploty kontrolován volnou hydroxylovou skupinou. Reakce vzniklého intermediátu s jodem poskytla jodalkohol *XLIII*, ve kterém byla zoxidovala primární hydroxylová skupina a zbývající methylenový uhlík byl připojen pomocí Wittigovy reakce za vzniku společného meziproduktu pro obě syntézy, látky *XLIV*. Přirozeným úmyslem bylo použít právě tento jododien jako precursor organokovové složky pro zamýšlený Negishiho coupling, protože na rozdíl od cyklických jodenonů *XXXIII* a *XL* neobsahuje funkční skupiny, které by interferovaly s výměnou jodu za lithium působením BuLi a následnou transmetalací ZnBr₂. Bohužel, veškeré pokusy o konverzi této látky na organokov



Obr. 12. Syntéza prekursoru postranního řetězce nakienonů



Obr. 13. Dokončení totální syntézy nakienonu B

skončily nezdarem, jehož pravděpodobnou příčinou byla β -eliminace za vzniku pent-1,3,4-trienu (XLV). Tento výsledek znamenal nutnost přidání dalších kroků, neboť na organokovové sloučeniny tak musely být převedeny výše zmíněné cyklické komponenty.

Jodenon XXXIII (obr. 13) byl proto zredukován na alkohol pomocí $\text{NaBH}_4/\text{CeCl}_3$ a vzniklý alkohol ochráněn jako TMS-ether. Výměna jodu za lithium při -125°C (při -78°C docházelo k migraci silylové chránicí skupiny) následovaná transmetalací poskytla organozinečnatý derivát XLVII, který s látkou XLIV hladce poskytl produkt Negishiho couplingu XLVIII za katalýzy běžným katalyzátorem, $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, a tato látka byla jednoduše převedena na nakienon B, totožný s přírodní látkou. Totální syntéza nakienonu A byla dokončena analogickým způsobem; klíčový krok ale vyžadoval použití podstatně reaktivnějšího katalyzátoru, připraveného *in situ* redukcí $\text{PdCl}_2[\text{P}(2\text{-furyl})_3]_2$ butyllithiem. Oběma syntézami^{28,29}, které využily triviálních výchozích materiálů, byla spolehlivě prokázána struktura nových přírodních látek.

4. Syntéza analog (–)inkrustoporinu

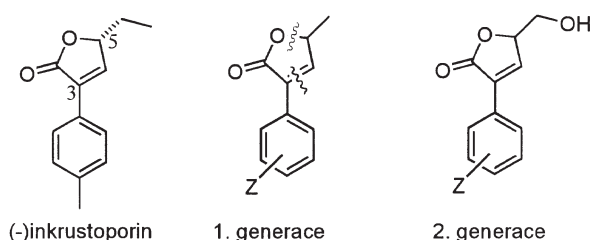
Jak bylo zmíněno v úvodu, zájem syntetických organických chemiků o přírodní látky je v řadě případů motivován

jejich zajímavými biologickými vlastnostmi. Vhodnými modifikacemi lze v principu zvýšit požadovanou aktivitu v daném směru a naopak potlačit nežádoucí vlastnosti. Řada přírodních látek tak posloužila jako předlohy pro přípravu léčiv.

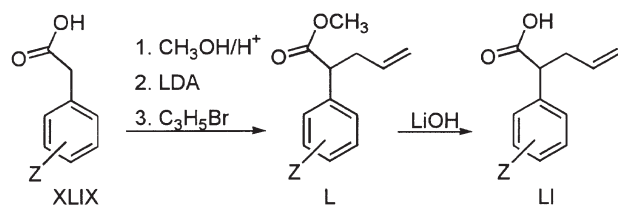
Nárůst počtu systémových mykotických infekcí, zejména u pacientů se sníženou imunitou, představuje závažný problém, vzhledem k vzrůstající rezistenci řady kmenů humánně patogenních hub vůči klinicky používaným antifungálním látkám a omezenému výběru přípravků pro léčbu mykóz, způsobených vláknitými houbami rodu *Aspergillus*. Při studiu vlastností (–)inkrustoporinu (obr. 14), sekundárního metabolitu houby *Incrustoporia carneola*, bylo zjištěno, že se vyznačuje aktivitou proti rostlinně patogenním houbám³⁰. Tento jednoduchý butenolid má malou, relativně rigidní molekulu s jedním centrem chiralit, a mj. i z těchto důvodů je vhodný k dalšímu vývoji jako potenciální léčivý přípravek. Vezme-li v úvahu obdobný případ griseofulvinu, bylo možné vyslovit spekulativní předpoklad, zda by tato látka nebyla účinná i proti humánně patogenním houbám, a zda by se tento účinek nedal ovlivnit vhodnou obměnou základní struktury 3,5-disubstituovaného-2,5-dihydrofuran-2-onu.

Struktura látky na první pohled nabízí dvě místa syntetických obměn, fenylový kruh v poloze 3 a substituent v poloze 5. Cílem návrhu první řady syntetických analogů³¹ (obr. 14)

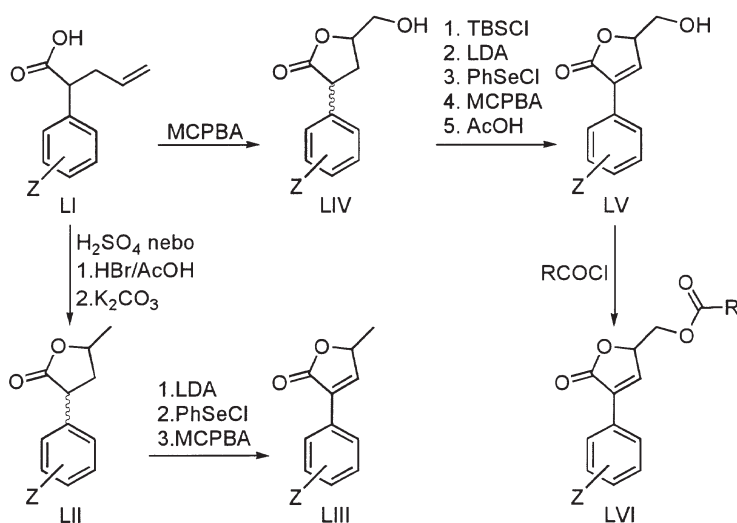
bylo proto nalezení vztahu mezi substitucí na fenylovém kruhu a antifungální aktivitou, přičemž pro zjednodušení byla zanedbána chiralita přírodní předlohy. Ze struktury (–)inkrustoporinu je patrné, že zdrojem fenyly s různými substituenty mohou být substituované fenylacetové kyseliny (XLIX), které by bylo možné, po alkylaci vhodným substituentem, cyklizovat na odpovídající tetrahydrofuran-2-ony. Karboxylová skupina výchozích kyselin tak byla ochráněna esterifikací a do α -polohy byl zaveden allylový zbytek pomocí sekvence enolizace/alkylace. Odstraněním esterové chránicí skupiny vznikly 2-fenylpent-4-enové kyseliny (LI) (obr. 15), které byly použity jako společné intermédiáty při syntézách první i druhé generace analog, znázorněných na obr. 16. Při přípravě první generace odvozených derivátů byly kyseliny LI cyklizovány koncentrovanou H_2SO_4 (kyseliny, obsahující fenylový zbytek,



Obr. 14. Struktura (–)inkrustoporinu a jeho syntetických analogů



Obr. 15. Příprava společného intermédiátu (LI) pro syntézu analogů (–)inkrustoporinu



Obr. 16. Syntéza analogů (–)inkrustoporinu

extrémně náchylný k elektrofilní substituci, jako např. p - $CH_3OC_6H_4$, byly cyklizovány reakcí s $HBr/AcOH$ a poté K_2CO_3) za vzniku diastereomerní směsi 3-fenyl-5-methyltetrahydrofuran-2-onů (LII), které byly opět enolizovány a vzniklý enolát podroben reakci s $PhSeCl$. Takto připravené fenylselanylderiváty podlehly po oxidaci spontánní *syn*-eliminaci za vzniku požadovaných 2,5-dihydrofuran-2-onů LIII. Biologické hodnocení této řady derivátů odhalilo, že substituce fenyly halogeny, zejména chlorem v poloze 3 a 4, vede k derivátům, jejichž biologická aktivita vůči některým druhům humánně patogenních vláknitých hub (*Aspergillus fumigatus*, *Abisidia corymbifera*) je na stejné úrovni jako ketokonazol. Příbuzný projekt³², zaměřený na záměnu fenylového kruhu pětičlenným heterocyklickým zbytkem, vedl ke zjištění, že výsledkem náhrady fenyly za takový typ substituentu jsou, naopak, analoga s nižší aktivitou. Účelem syntézy druhé generace analog³³ bylo ověření vlivu zavedení hydrofilní skupiny do substituentu v poloze 5. Kyseliny LI byly epoxidovány působením m -chlorperoxybenzoové kyseliny, přičemž současně došlo k uzavření kruhu za vzniku 3-fenyl-5-hydroxymethyltetrahydrofuran-2-onů (LIV), do kterých byla, se současným použitím chránicí skupiny, zavedena dvojná vazba jako v předchozím případě. Antifungální aktivita 3-fenyl-5-hydroxymethyl-2,5-dihydrofuranonů (LV) byla nízká až střední, avšak dramaticky vzrostla po esterifikaci primární hydroxylové skupiny. 5-acyloxymethyl-2,5-dihydrofuran-2-ony (LVI) mají antifungální účinek *in vitro* srovnatelný s jednou z nejsilnějších klinicky používaných látek, amfotericinem B. V rámci této studie byla jedna z látek tohoto typu rovněž rozdělena na enantiomery na chirální HPLC koloně a při jejich biologickém hodnocení bylo, poněkud překvapivě, zjištěno, že oba enantiomery mají téměř stejnou *in vitro* účinnost, která se příliš neliší od aktivity racemátu. I když struktura analogů (–)inkrustoporinu, ze které vyplývá schopnost těchto látek chovat se jako Michaelovy akceptory, svádí k domněnce, že podstatou mechanismu účinku je intracelulární adice nukleofilu, nedávno zveřejněná studie³⁴ prokázala, že tento proces zřejmě nehraje významnou roli.

Poměrně jednoduché syntetické studie spočívající v ob-

měně základní struktury přírodní látky tak ukázaly, že butenolidy s určitými strukturními rysy mají významné antifungální vlastnosti a jsou proto perspektivní pro další vývoj jako potenciální léčivé přípravky.

5. Závěr

Diskutované příklady jsou dalšími z řady dokladů toho, že syntéza přírodních látek a jejich analog je stále živou oblastí organické chemie, která se nemusí obávat o svou budoucnost. Jak dokládá i řada dalších syntéz, lze i v tomto referátu nalézt odpověď na občas se vyskytující názor na organickou syntézu jako „dospělou vědu“, která s použitím moderní metodologie může připravit jakoukoli molekulu bez zbytečných průtahů, tj. např. stejným stylem, jakým stavební firma postaví dům. Aplikací syntetických metod na přípravu konkrétních molekul lze předejším dále zkoumat jejich možnosti a omezení, ale výsledek nelze spolehlivě předjímat, zejména pracujeme-li s molekulami, ve kterých je řada interaktivních funkčních skupin umístěna na relativně malém skeletu. Jedno z opravdových kouzel organické syntézy tak stále spočívá v nalezení neobvyklého, resp. neočekávaného, byť to nemusí být za všech okolností vítáno.

Za finanční podporu výzkumu analogů inkrustoporinu děkuji Grantové agentuře UK (projekty č. 171/1997 a 259/2001), Fondu rozvoje vysokých škol (projekt č. 1270/1999) a Ministerstvu školství ČR (projekt č. VS 97 124).

LITERATURA

1. P. J. Davies: *Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development*. Martinus Nijhoff, Dordrecht 1987.
2. Mander L. N.: *Chem. Rev.* 92, 573 (1992).
3. Döpp W.: *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 63, 139 (1950).
4. Döpp W.: *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 72, 11 (1959).
5. Näf U., Nakanishi K., Endo M.: *Bot. Rev.* 41, 315 (1975).
6. Sharp P. B., Keitt G. W., Clum H. H., Näf U.: *Physiol. Plant.* 34, 101 (1975).
7. Schraudolf H.: *Nature* 201, 98 (1964).
8. Voeller B.: *Science* 143, 373 (1964).
9. Nakanishi K., Endo M., Näf U., Johnson L. F.: *J. Am. Chem. Soc.* 93, 5579 (1971).
10. Corey E. J., Myers A. G., Schraudolf H., Takahashi N., Yamane H.: *Tetrahedron Lett.* 27, 5083 (1986).
11. Corey E. J., Myers A. G.: *J. Am. Chem. Soc.* 107, 5574 (1985).
12. Zanno P. R., Endo M., Nakanishi K., Näf U., Stein C.: *Naturwissenschaften* 512, 12 (1972).
13. Yamane H., Nohara K., Takahashi N., Schraudolf H.: *Plant Cell Physiol.* 28, 1203 (1987).
14. Nester J. E., Veysey S., Coolbaugh R. C.: *Planta* 170, 26 (1987).
15. Furber M., Mander L. N., Nester J. E., Takahashi N., Yamane H.: *Phytochemistry* 28, 63 (1989).
16. Furber M., Mander L. N.: *J. Am. Chem. Soc.* 110, 4084 (1988).
17. Yamane H., Takahashi N., Takeno K., Furuya M.: *Planta* 147, 251 (1979).
18. Yamane H., Satoh Y., Nohara K., Nakayama M., Murofushi N., Takahashi N., Takeno K., Furuya M., Furber M., Mander L. N.: *Tetrahedron Lett.* 29, 3959 (1988).
19. Furber M., Mander L. N., Patrick G. L.: *J. Org. Chem.* 55, 4860 (1990).
20. Yamaguchi I., Yokota T., Murofushi N., Takahashi N., Ogawa Y.: *Agric. Biol. Chem.* 39, 2399 (1975).
21. Yamaguchi I., Yokota T., Murofushi N., Takahashi N.: *Agric. Biol. Chem.* 39, 2405 (1975).
22. Tamura S., Takahashi N., Murofushi N., Iriuchijima S., Kato, J. Wada Y., Watanabe E., Aoyama T.: *Tetrahedron Lett.* 1966, 2465.
23. Pour M., Kraft-Klaunzer P., Mander L. N., Twitchin B., Oyama N., Murofushi N., Yamane H., Yamauchi T.: *Aust. J. Chem.* 50, 289 (1997).
24. Oyama N., Yamauchi T., Yamane H., Murofushi N., Agatsuma M., Pour M., Mander L. N.: *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 60, 305 (1996).
25. Pour M., Wynne G. M., Mander L. N., Willis A. C.: *Tetrahedron Lett.* 39, 1991 (1998).
26. Pour M., Willis A. C., Furber M., Mander L. N.: *Tetrahedron* 54, 13833 (1998).
27. Nagle D., Gerwick W. H.: *Tetrahedron Lett.* 36, 849 (1995).
28. Pour M., Negishi E.: *Tetrahedron Lett.* 37, 4679 (1996).
29. Pour M., Negishi E.: *Tetrahedron Lett.* 38, 525 (1997).
30. Zapf S., Anke T., Sterner O.: *Acta Chem. Scand.* 49, 233 (1995).
31. Pour M., Špulák M., Balšánek V., Kuneš J., Buchta V., Waissner K.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 10, 1893 (2000).
32. Kuneš J., Balšánek V., Pour M., Buchta V.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 66, 1809 (2001).
33. Pour M., Špulák M., Buchta V., Kubanová P., Vopršalová M., Wsól V., Fáková H., Koudelka P., Pourová H., Schiller R.: *J. Med. Chem.* 44, 2701 (2001).
34. Pour M., Špulák M., Balšánek V., Kuneš J., Kubanová P., Buchta V.: *Bioorg. Med. Chem.* 11, 2843 (2003).

M. Pour (*Department of Inorganic and Organic Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Králové*): **Gibberellins, Antheridiogens and Incrustoporins: A Personal Account of Syntheses of Small, Highly Functionalized Molecules**

A description of author's achievements in the synthesis of natural products and their analogues, including partial syntheses of plant hormones gibberellins and antheridiogens, total syntheses of marine natural products nakienones A and B, and the preparation of analogues of a butenolide secondary metabolite, (–)-incrustoporin. Both classic and modern synthetic chemistry methods were employed; at that, undesirable reactivity was encountered, especially when highly reactive functionalities had to be accommodated on a relatively small matrix.

PŘÍRODNÍ LÁTKY OVLIVŇUJÍCÍ MEZIBUNĚČNOU KOMUNIKACI

HANA FOREJTŇÍKOVÁ a RENATA KUBÍNOVÁ

Ústav přírodních léčiv, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita, Palackého 1/3, 612 42 Brno
haforej@hotmail.com

Došlo 29.10.02, přepracováno 21.8.03, přijato 18.9.03.

Klíčová slova: mezibuněčná komunikace, mezerové spoje, konexiny, přírodní modulátory mezibuněčné komunikace

Obsah

1. Úvod
2. Mezerové spoje
 - 2.1. Struktura mezerového spojení
 - 2.2. Regulace mezerových spojů a endogenní modulátory
 - 2.3. Experimentální metody měření funkčnosti
3. Vnitřní a vnější vlivy na kvalitu mezibuněčné komunikace
4. Exogenní modulátory mezibuněčné komunikace
5. Závěr

1. Úvod

Počet nádorových onemocnění stále stoupá. V současnosti v rozvinutých státech představují druhou hlavní příčinu smrti za kardiovaskulárními onemocněními. Existují předpoklady, že v nejbližší době odsunou kardiovaskulární úmrtí a stanou se hlavní příčinou, neboť preventivní i terapeutické postupy jsou u kardiovaskulárních chorob stále efektivnější. Již nyní onemocní v rozvinutých státech některým typem malignity v průběhu života každý třetí jedinec a u poloviny z postižených je nádorové onemocnění hlavní příčinou smrti.

Dřívější studie kancerogeneze ukázaly, že vznik nádoru probíhá ve třech relativně dobře charakterizovaných etapách: iniciaci, promoci a progresi. Dlouhou dobu se předpokládalo, že kancerogeneze je především výsledkem mutagenního (genotoxického) působení xenobiotik (např. nitrosaminů, onkovirů, UV záření). Později se ukázalo, že vývoj nádoru je podporován i epigenetickými (negenotoxickými) účinky látek. Tato xenobiotika mění expresi genů vedoucí ke změnám parametrů proliferace, diferenciace a programované buněčné smrti – apoptózy. Účinkem cizorodých látek mohou být ovlivněny hladiny hormonů, signálních molekul a přímo regulace transkripce a translace. Expozice negenotoxickým kancerogenem se tak projevují především v promoční fázi kancerogeneze zvýšenou proliferací transformovaných buněk, inhibicí apoptózy a mezibuněčné komunikace, tedy procesů regulujících

buněčný růst¹. Buňky ztrácí svou schopnost udržovat homeostasu a získávají možnost rozvoje kancerogenních procesů. Ukázalo se, že rozvoj kancerogeneze je zřejmě spjat se změnami intercelulárních a intracelulárních cest přenosu signálu a buněčných pohybů v cílových tkáních².

Jedním z biomarkerů promoce kancerogeneze je inhibice mezibuněčné komunikace zprostředkované mezerovými spoji (gap junctional intercellular communication – GJIC). Tyto spoje hrají důležitou integrující roli v udržování homeostasy v organismu. Jde o kanálky zajišťující koordinaci aktivity sousedících buněk; jimi je v dané tkáni řízen růst, vývoj a diferenciace buněk. Vzhledem k důležitému postavení GJIC ve fyziologických procesech není překvapující, že jejich porušení je spojováno s mnoha patologickými procesy, ke kterým patří např. chronická srdeční onemocnění, osteoporóza, epilepsie, artritida, poruchy imunity a také mnoho druhů zhoubných nádorových onemocnění. Inhibice (tzv. down-regulace) mezerových spojů je integrujícím znakem tkáňového poškození³.

V rostlinné říši byla objevena řada látek, které patří mezi významné tumorové inhibitory podílející se na otvírání mezerových spojů. Jsou to zejména sekundární metabolity ze skupiny flavonoidů, resveratrol, některé karotenoidy, retinoidy a ginsenosidy.

2. Mezerové spoje

Aby se mohl mnohobuněčný organismus rychleji přizpůsobovat změnám životního prostředí, byl vytvořen systém, který umožňuje skupinám propojených buněk vzájemnou koordinaci svého chování a buněčnou odpověď na mimobuněčné stimuly. Tuto koordinaci umožňují specializované mezibuněčné kanálky, zvané mezerové spoje (gap junctions). Tyto kanálky jsou přítomny u všech mnohobuněčných organismů, a to téměř ve všech tkáních. Výjimku tvoří buňky kosterních svalů a krevní elementy. Funkčně jde o totožné struktury, liší se na molekulární úrovni strukturních bílkovinných komponent. Mezerové spoje usnadňují přímou výměnu iontů a nízkomolekulárních látek o molekulové hmotnosti menší než 2000 Da (např. Ca^{2+} , cAMP, glutathion), ale i některých dalších molekul do velikosti 1,5 nm (např. aminokyselin, cukrů, nukleotidů). Výměna se uskutečňuje z cytoplazmy do cytoplazmy mezi sousedícími buňkami.

Z funkčního hlediska patří mezerové kanálky spolu s chemickými synapsemi mezi komunikační spoje, které zprostředkovávají přenos chemických nebo elektrických signálů mezi interagujícími buňkami.

Mezibuněčné spoje jsou citlivé ke spouštěcím signálům ze životního prostředí (např. polycyklickým aromatickým uhlovodíkům), které mohou zablokovat buněčnou komunikaci uzavřením mezerových kanálků. Toto potlačení GJIC nastane do několika minut po vystavení účinkům xenobiotik a je reverzibilní. Na základě řady *in vitro* a *in vivo* studií bylo zjištěno, že narušení GJIC se pravděpodobně podílí na vzniku nádoru¹.

Funkce mezerových spojů:

- udržování homeostasy v tkáních (rychlá distribuce živin, iontů, tekutin a signálních molekul, podílejících se na modulaci buněčného růstu, apoptózy a diferenciaci);
- elektrické spojení (mezerové spoje slouží jako elektrické synapse u elektricky excitovatelných buněk, např. neuronů, srdečních myocytů, buněk hladkého svalstva); Tím se podílejí na regulaci;
- tkáňové odpovědi na hormony (GJIC zvyšují schopnost tkáně rychle reagovat na vnější stimuly);
- embryonálního vývoje (mezibuněčná cesta pro chemické a elektrické signály potřebné pro embryonální vývoj).

2.1. Struktura mezerového spojení

Mezibuněčné kanálky obratlovců jsou složeny z bílkovin nazývaných konexiny. Ve tkáních savců bylo dosud identifikováno 15 genů pro konexiny⁴. Šest konexinů se sdružuje do proteinového kanálku zvaného konexon. Jde v podstatě o kanálek v cytoplazmatické membráně buňky, který se těsně přibližuje (na vzdálenost 2–3 nm) ke konexonu sousední buňky, aby společně vytvořily kontinuální průchod pro hydrofilní molekuly. Konexinový protein překrnuje membránu čtyřikrát a vytváří tak strukturu připomínající tvarem písmeno M, přičemž aminové a karboxylové konce proteinu jsou umístěny v cytoplazmě. Domény procházející membránou jsou kritickými determinanty správného umístění konexinu. Asociací třetích transmembránových domén konexinů, které obsahují velké množství hydrofilních aminokyselin, vzniká vnitřní „stěna“ póru.

Struktura čtyř transmembránových domén, dvou mimobuněčných smyček i aminového konce je u všech konexinů do značné míry zachována. Více odlišné jsou v ostatních úsecích, které se nacházejí v cytoplazmě. Tyto úseky se účastní regulace vzniku a permeability kanálku. Skládání konexinu i interakce konexin–konexin a konexon–konexon se uskutečňují disulfidovými vazbami, interakcí hydrofóbních částí proteinů, ale i pomocí dalších, dosud ne zcela objasněných sil¹.

Konexiny (Cx) se liší molekulovou hmotností vyjádřenou v kDa (např. Cx32, Cx43), uspořádáním aminokyselin a rozdílnou délkou karboxylového konce⁵. Expres konexinů je buněčně, tkáňově a vývojově specifická, ve většině tkání dochází k expresi více různých konexinů. Přehled některých hlavních konexinů a jejich lokalizace v organismu je uveden v tabulce I.

Neoplastické buňky mají mezerových kanálků méně nebo menší velikosti, exprimují méně konexinu ve srovnání se zdravými buňkami¹. Defekty GJIC se objevují na různých úrovních. Nádorové buňky mohou buď postrádat funkční (permeabilní) mezerové spoje anebo mají funkční homologní GJIC (pouze v nádorové tkáni), ale nejsou schopny vytvořit fungující kanálek s nenádorovou buňkou (heterologní GJIC). Nádorové buňky jsou tak vyvázané z homeostatické kontroly růstu a nemohou komunikovat s okolními buňkami⁶.

2.2. Regulace mezerových spojů a endogenní modulatory

Počet a velikost mezerových spojů závisí na buněčném cyklu, fyziologickém stavu organismu/tkáně a vlivu faktorů životního prostředí¹.

Tabulka I

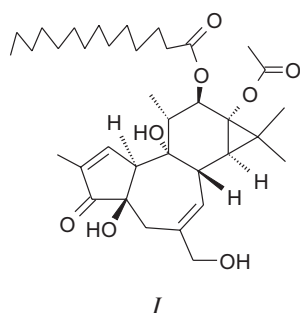
Přehled nejznámějších savčích konexinů a jejich lokalizace v organismu

Konexin	Tkáň
Cx26	hepatocyty, pankreas, endometrium
Cx30	mozek, kůže
Cx30.3	kůže
Cx31	kůže, placenta
Cx31.1	kůže
Cx32	hepatocyty, ledviny, pankreas
Cx33	varlata
Cx37	plice, vaječníky, endotel
Cx40	endotel, hladké svalstvo, myokard, plíce
Cx43	epitel, srdce, děloha, mozek
Cx45	ledviny, kůže
Cx46	čočka
Cx50	čočka

Transport látek mezerovými spoji se děje pasivní difuzí a je regulován vrátkovým mechanismem. Selektivita a permeabilita kanálku závisí na typu konexinu tvořícího mezerový spoj³. Je známo asi 15 typů konexinů s molekulovou hmotností od 26 do 57 kDa (cit.⁴). Konexiny byly nalezeny nejen u savců a dalších obratlovců, ale také u bezobratlých, jako je např. medúza či nezmar. Podobné struktury, známé jako plazmodesmata, byly nalezeny u rostlin. Mnoho buněk exprimuje více než jeden typ konexinu. První klonovaný konexin 43 byl objeven u buněk srdečního svalstva. Tento typ buněk exprimuje také konexiny 40, 45 a 46. V parenchymatických buňkách jsou exprimovány především konexiny 32 a 26 (cit.¹).

Mechanismy regulace mezerových spojů nejsou doposud plně objasněny. Nejvíce informací o sestavování těchto kanálků je shromážděno pro konexin 43 (cit.⁷). Šest podjednotek konexinu 43 oligomerizuje v Golgiho aparátu a jsou transportovány do plazmatické membrány. V této fázi jsou konexony uzavřeny, aby nedocházelo k úniku parenchymatických komponent nebo vstupu mimobuněčných složek. V plazmatické membráně jsou pak konexony sousedících buněk přitahovány silami, které nejsou doposud plně objasněny. Koncové části konexonů se k sobě připojí a vytvoří kompletní mezerový kanálek. Následně kanálky agregují do větších shluků (tzv. plaku), otevrou se a propojí vnitřní prostředí sousedících buněk⁸. Posloupnost těchto dvou posledních stupňů je však diskutabilní. Souhra mezi utvářením otevřených kanálků a agregací částí kanálků do plaku je způsobena fosforylací konexinu 43 nejmeně na dvou místech. Kinasou provádějící tuto fosforylaci je s největší pravděpodobností proteinkinasa A (cit.¹). Fosforylace zvyšuje agregaci konexonů, permeabilitu kanálků a stabilitu konexinu 43. Utváření kanálků vyžaduje také patřičnou buněčnou adhezi. Zdá se, že zvláště důležitými molekulami umožňujícími tuto adhezi jsou transmembránové vazebné proteiny kadheriny⁹.

Otevírání a zavírání mezerových kanálků je řízeno několika různými mechanismy. Jde o reverzibilní přechod mezi otevřenou a uzavřenou konformací kanálku, který může být výsledkem nekovalentních (např. elektrostatických nebo van



der Waalsových sil) nebo kovalentních (např. fosforylace) modifikací struktury kanálku. Vrátkování může být řízeno i farmakologicky nebo pomocí extra- i intracelulárních mediátorů⁸.

Mechanismy regulace mezerových spojů zahrnují zejména vliv nízké koncentrace vodíkových iontů či vyšší hladinu vápenatých iontů v buňce, rozdíl napětí mezi kanálky¹⁰ nebo působení volných radikálů¹¹. Vysoké buněčné hladiny radikálů snižují permeabilitu mezerových kanálků. Tento mechanismus je pravděpodobně složitý. Radikály mohou přímo ovlivňovat konexiny a další plazmatické komponenty (např. lipidy), aktivovat proteinkinasu C a také mohou regulovat hladinu vápenatých iontů v buňce¹².

Zajímavé poznatky přicházejí především ze studií řízení vrátkování fosforylací. Mnoho proteinkinas má schopnost fosforylovat konexiny a tím měnit jejich terciární strukturu, která podmiňuje otevření nebo uzavření kanálku. Jediný konexin, který nemůže být fosforylován, je Cx26 (cit.⁸). Aktivace proteinkinasy A indukuje fosforylaci konexinu 32 a konexinu 42 na serinových zbytcích karboxylového konce kanálku lokalizovaného v cytoplazmě. Tato fosforylace je spojena se zvýšením počtu mezerových kanálků a jejich průchodnosti¹⁰.

Fosforylace konexinů je však také předpokládaným mechanismem účinku mnoha negenotoxicky působících kancerogenů. Většina nádorových promotorů, které byly dosud prozkoumány (více než 100 sloučenin), má schopnost snižovat permeabilitu nebo zcela uzavírat mezerové spoje v testech *in vitro* i *in vivo*. V mnoha případech jde o buněčně-specifický účinek¹.

Nejlépe je prostudována inhibice mezerových spojů působením forbolesterů, jakým je např. forbol-12-myristát-13-acetát (PMA) (I). PMA uzavírá mezerové spoje v celé řadě buněčných kultur¹³. Inhibiční účinek PMA spočívá v aktivaci proteinkinasy C (PKC), která následně fosforyluje konexin 43. Zvýšení hladiny celkové PKC může citlivost buněk zvýšit. Pomocí specifických inhibitorů různých isoenzymů PKC bylo zjištěno, že za fosforylaci konexinu 43 odpovídá především isoenzym PKC α (kalciem-dependntní proteinkinasa C) (cit.⁴).

Kromě přímé fosforylace konexinu 43 proteinkinase C (cit.¹⁴) existuje ještě druhá možná dráha regulace konexinu 43 v buňce vystavené PMA. Trosko a Ruch¹⁵ ve své studii popsali nepřímou fosforylaci konexinu 43 proteinkinase C. Tato fosforylace je zprostředkována kinasami regulovanými mimobuněčnými signály (ERKs), které patří do širší skupiny proteinkinas aktivovaných mitogeny (MAPKs). ERKs jsou aktivovány mitogeny, stresem a také již zmiňovaným PMA. Podílejí se na buněčném růstu, diferenciaci, odpovědi na stres

a na dalších fyziologických funkcích buňky¹⁶. Cílovými místy ERKs jsou cytosolové proteiny a jaderné transkripční faktory¹⁵.

Příkladem další látky podílející se na inhibici mezibuněčné komunikace je fenobarbital. Byly prováděny testy *in vivo* a výsledky ukazují, že fenobarbital blokuje konexin 32 lokalizovaný v hepatocytech, ale neovlivňuje konexin 43 nacházející se zejména v epiteliálních buňkách a fibroblastech. Mechanismem inhibice GJIC je snížení hladiny mRNA pro konexin 32 (cit.¹³).

Pesticid DDT [1,1,1-trichlor-2,2-bis(4-chlorofenyl)ethan] blokuje GJIC v epiteliálních buňkách i hepatocytech. DDT způsobuje rychlou inhibici permeability mezerových spojů s následnou internalizací a degradací v lysozomech. Internalizace a degradace se však týká pouze epiteliálních buněk exprimujících Cx43, u Cx32 nebyly tyto účinky pozorovány. Z dalších pesticidů působí inhibici GJIC např. dieldrin, heptachlor nebo lindan¹⁷.

Též aktivace některých onkogenů (v-Src nebo v-Ha-Ras) je spojována s inhibicí GJIC. Produkt Src genu je zodpovědný za fosforylaci tyrosinových zbytků konexinu 43, což vede k uzavírání mezerových spojů¹⁸.

Přítomnost řady růstových faktorů např. epidermálního růstového faktoru (EGF) či fibroblastického růstového faktoru, vede k inhibici GJIC. Inhibice souvisí s fosforylací konexinu 43 na serinových zbytcích proteinkinasy aktivovanými mitogeny (MAPKs) (cit.¹⁹). EGF stimuluje MAPKs v závislosti na délce působení a dávce. EGF též stimuluje fosfolipasu C, jejímž působením vznikají druží poslove inositol-1,4,5-trifosfát a diacylglycerol, kteří stimulují uvolnění intracelulárního vápníku a aktivaci PKC (cit.²⁰).

Početnou skupinu inhibitorů mezerových spojů také tvoří polycyklické aromatické uhlovodíky (PAHs). Nejsilnější inhibici vykazují zejména PAHs s relativně malými molekulami, jako jsou fluoranthen, fenantren, fluoren²¹.

Na druhé straně též existuje celá řada látek podílejících se na stimulaci GJIC. Obnovení permeability mezerových spojů v tumorových buňkách může vést k navrácení regulace růstu, a tak k redukci nádorového bujení. Mechanismus účinku těchto látek není zatím zcela jasný, ale nejčastěji jde, podobně jako u mechanismu inhibice, o ovlivnění konexinů 32 a 43. Je zajímavé, že řada těchto látek patří mezi antioxidanty (např. resveratrol, superoxiddismutasa, polyfenoly zeleného čaje), dále jsou to látky ovlivňující signální přenos a aktivitu některých proteinkinas (cAMP) (cit.¹). Obnovy GJIC se mohou účastnit též antionkogenní látky, které snižují aktivaci onkogenů podílejících se na inhibici GJIC v nádorově transformovaných buňkách. Příkladem je lovastatin²², thalidomid²³ či 2-fenylethylester kyseliny kávové²⁴. Antionkogenní efekt byl pozorován též u dexamethazonu na potkaních hepatocytech¹⁷.

Prevence inhibice GJIC během promoční fáze kancerogeneze a obnovení mezibuněčné komunikace po nádorové konverzi může být základem chemoprevence.

2.3. Experimentální metody měření funkčnosti

Inhibice GJIC *in vitro* ve vhodné modelové buněčné linii je považována za parametr detekující velmi pravděpodobně tumor-promoční vlastnosti testované látky.

Modulace mezerových spojů může být měřena několika způsoby. Nejčastěji je to sledování transportu barviva kanálky metodou SL/DT (scrape loading/dye transfer)²⁵. Sleduje se průnik nízkomolekulárního fluorescenčního barviva mezerovými kanálky od místa řezu skalpelem. Barvivo je schopno procházet pouze těmito kanálky. Délka jeho transportní dráhy závisí na průchodnosti kanálků, která je ovlivněna expozicí testovaným látkám.

Alternativou k metodě SL/DT je sledování průniku fluorescenčního barviva, které difunduje mezerovými kanálky po mikroinjekci do vybraných buněk²⁶.

Další možností je detekce konexinů. Western blot je technika sloužící k určení typu, množství a velikosti post-translačních změn (např. fosforylace) konexinů. Po elektroforetické separaci konexinů v gelové matici následuje elektroforetický přenos z gelu na membránu. Tato matrice je přístupnější pro metody využívající imunisorbentů s navázaným enzymem. K identifikaci typu konexinu se využívají specifické protilátky²⁷.

Semikvantitativní metoda RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction – reverzní transkripční polymerasová řetězová reakce) je velmi citlivá pro analýzu mRNA. Slouží pro studium regulace transkripce²⁷. Imunofluorescenční technika značení konexinů přímo zobrazuje mezerový kanálek. Fixované buňky jsou značeny králičími polyklonálními protilátkami proti určitému typu konexinu. Následuje lokalizace komplexu antigen–protilátka pomocí IgG proti králičí protilátce; IgG je značeno zeleným fluorescenčním proteinem, který umožní přímou fluorescenční detekci²⁸.

Analýza FRAP (fluorescence redistribution after photobleaching) je vhodná pro studium buněčného individua uvnitř populace. Buňky se obarví karboxyfluorescein diacetátem a po selektivním odbarvení buňky působením laseru se sleduje průnik fluorescenční barvy ze sousedních značených buněk zpět do odbarvené buňky²⁷.

Existují také další méně používané metody, např. sledování průniku radioaktivního metabolitu, metabolická kooperace buněk s enzymatickým deficitem v určitých metabolických drahách nebo měření elektrické vodivosti mezerových kanálků.

3. Vnitřní a vnější vlivy na kvalitu mezibuněčné komunikace

V organismu se mohou vyskytnout různé typy nádorového bujení. I při jejich variabilitě existují určité společné znaky. Kancerogenní buňky nereagují na kontaktní inhibici růstu, vymykají se homeostatické kontrole okolních buněk, nejsou schopny terminální diferenciace, dochází u nich ke zvýšení proliferace a naopak k inhibici apoptických procesů²⁹. V průběhu dalšího růstu tumoru podléhají buňky opětovným genotypovým a fenotypovým změnám. S těmito buněčnými procesy úzce souvisí modulace klíčových buněčných pochodů: signální transdukce, aktivace transkripčních faktorů, modulace komponent buněčného cyklu atd.

Promotory kancerogeneze působí na celou řadu klíčových buněčných procesů²:

- modulaci hladin endogenních extracelulárních signálních molekul, indukci nebo inhibici enzymů biosyntézy a metabolismu těchto látek (především cytochromů P450);

- oxidační poškození membránových lipidů, nukleových kyselin a intracelulárních proteinů;
- změnu buněčných signálních drah a genové exprese (modulace cytosolových a jaderných receptorů a aktivity dalších transkripčních faktorů, aktivace proteinkinas);
- epigenetické efekty na DNA (methylace, acetylacem apod.).

Modulace buněčných pochodů promotory kancerogeneze může vést jednak ke stimulaci buněčné proliferace, změnám diferenciace a apoptózy buněk anebo k inhibici mezibuněčné komunikace.

4. Exogenní modulatory mezibuněčné komunikace

Látky blokující účinky nádorových promotorů a stimulující mezibuněčnou komunikaci v nádorových buňkách jsou velmi různorodé a zahrnují dietní komponenty, hormony, vitaminy a léčiva. Vzhledem k tomu, že buňky nádoru jsou velmi heterogenní a vytvářejí subpopulace buněk s různými typy poškození, není možné, aby pouze jedna látka účinně modulovala mezibuněčnou komunikaci v celém nádoru. Proto je nutné kombinovat jednotlivé látky stimulující GJIC, případně i s dalšími terapeutickými metodami¹. Vhodné je hledat stimulatory mezibuněčné komunikace mezi látkami biogenního původu, které jsou součástí běžné stravy člověka.

Látky přírodního původu patří v současnosti mezi jedny z nejvíce prozkoumaných inhibitorů promoční fáze nádorového bujení. Efekty těchto látek můžeme rozdělit na dvě skupiny. Jednak jsou to látky, které mohou blokovat inhibiční účinek promotorů na GJIC (tabulka II). Mechanismus působení těchto látek není zatím zcela objasněn, ale často jde o látky se silným antioxidačním účinkem, který by se pravděpodobně mohl podílet na regulaci GJIC. Kromě látek rostlinného původu jsou to např. superoxiddismutasa nebo *N,N'*-difenylyl-1,4-fenylendiamin (DPPD) (cit.¹). Druhou skupinu tvoří látky schopné indukovat GJIC v nádorových buňkách (tabulka III). Obnovení mezibuněčné komunikace v nádorových buňkách je poměrně složitá otázka, ale i přesto byli v rostlinné říši nalezeni úspěšní zástupci.

Flavonoidy jsou hojně rozšířenou skupinou přírodních polyfenolů. Řada z nich vykazuje silné antioxidační účinky, je známa též jejich antivirová, antibakteriální, antimutagenní a protizánětlivá aktivita. V současné době se flavonoidním látkám připisuje prominentní role v prevenci nádorových onemocnění⁴⁶.

V experimentech *in vitro* byla testována řada flavonoidů, z nichž nejúčinnějšími stimulatory GJIC byly shledány apigenin (II) nacházející se v celé řadě léčivých rostlin (př. *Achillea millefolium*, *Ginkgo biloba*, *Glycyrrhiza glabra*) a tangeretin (III) přítomný zejména v citrusech. Bylo zjištěno, že oba zabraňují inhibici GJIC v hepatocytech potkanů indukovanou tumorovými promotory PMA a 2-*terc*-butyl-4-methylfenolem (BHT) (cit.³¹). Stimulace GJIC apigeninem je spjatá s ovlivněním množství mRNA pro konexin 43, a to stimulací transkripce konexinu 43 anebo stabilizací mRNA.

Tangeretin neovlivňuje množství mRNA pro konexin 43, stimulace GJIC se pravděpodobně děje translačním nebo post-translačním mechanismem³⁰.

Dalšími flavonoidy testovanými jako možné stimulatory GJIC byly naringenin, myricetin³¹ a chrysin⁴⁷, avšak jejich stimulační účinky se neprokázaly.

Tabulka II

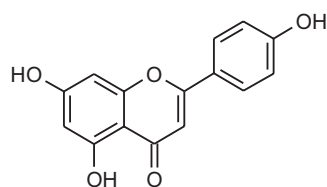
Látky přírodního původu preventivně zabraňující inhibici GJIC způsobené kancerogeny

Kancerogen	Blokující látka	Buněčná tkáň	Konexin	Lit.
BHT	apigenin, tangeretin	jaterní epiteliální buňky potkanů	Cx43	30,31
DDT	resveratrol, α -tokoferol, epikatechin	jaterní epiteliální buňky myší a potkanů	Cx32, Cx43	32,33
H ₂ O ₂	epikatechin, ginsenosid Rb ₂	jaterní epiteliální buňky potkanů	Cx43	34,35
Lindan	α -tokoferol	potkaní myocyty	Cx43	36
Fenobarbital	α -tokoferol	jaterní epiteliální buňky myší	Cx32	37
PMA	apigenin, epikatechin, ginsenosid Rb ₂ , karotenoidy, retinoidy, resveratrol, tangeretin	jaterní epiteliální buňky potkanů, fibroblasty myší a křečků	Cx43	30,31, 32,34, 37
Pentachlorfenol	extrakt ze zeleného čaje	myší játra	Cx26, Cx32	38

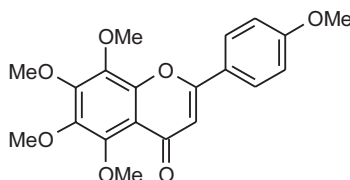
Tabulka III

Látky přírodního původu stimulující GJIC v normálních nebo neoplastických buňkách

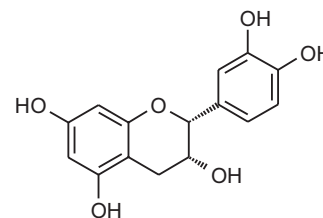
Buněčná tkáň	Látka	Konexin	Lit.
Lidské bronchiální epiteliální buňky	kyselina retinová	Cx32	39
Lidské fetální fibroblasty	lykopen, kyselina retinová	Cx43	40
Lidský neuroblastom	kyselina retinová	Cx43	41
Lidský karcinom prostaty	lykopen	Cx43	42
Myší sarkom, myší fibroblasty	retinoidy, karotenoidy	Cx43	43
Ras-transformované jaterní epiteliální buňky potkanů	2-fenylethylester kyselina kávové	Cx43	24
Jaterní epiteliální buňky potkanů	α - a β -karoten, lykopen	Cx26, Cx32	44
Lidské kožní fibroblasty	vitamin D ₃	Cx43	45



II



III



IV

Bohatým zdrojem polyfenolů tzv. katechinů je zelený čaj (*Camellia sinensis*). Obsahuje celou škálu látek s chemoprotektivní aktivitou působících proti rozvoji řady nádorů. Protektivní efekt je zprostředkován zejména silnou antioxidační aktivitou čajových polyfenolů, které jsou schopny redukovat superoxidový a hydroxylový radikál. Složky čaje jsou schopny, kromě iniciační, ovlivňovat také promoční fázi karcinogenního procesu. Snižují proliferaci buněk, podporují mezibuněčnou komunikaci, inhibují telomerasu, indukují apoptózu a z mnoha dalších účinků byla popsána i inhibice angiogeneze. Také zvyšují hladinu některých enzymů a indukují cytochrom P450, což hraje důležitou roli v buněčné detoxikaci některých kancerogenů⁴⁸.

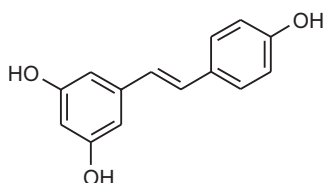
Kang a spol.³⁴ sledovali vliv epikatechinu, epikatechin-gallátu a epigallokatechin-gallátu na uzavření mezerových spojů vyvolané PMA a H₂O₂ v potkaních epiteliálních buň-

kách WB-F344 v modelu *in vitro*. Ačkoliv se již dříve objevilo několik zmínek o antikancerogenních účincích testovaných katechinů, pouze epikatechin (IV) obnovoval permeabilitu GJIC. Silnější účinek se projevil při inhibici GJIC vyvolanou PMA nežli H₂O₂. Epikatechin brání fosforylaci konexinu 43 v buněčné linii WB-F344 s vysokou hladinou mezerových spojů tvořených konexinem 43 (cit.⁴⁹). Jiná studie potvrzuje též preventivní účinek epigallokatechin-gallátu a epikatechin-gallátu na uzavření mezerových spojů indukovaných dalším modelovým inhibitorem DDT v buňkách WB-F344, jehož efekt souvisí s fosforylací konexinu 32 i 43 (cit.³³).

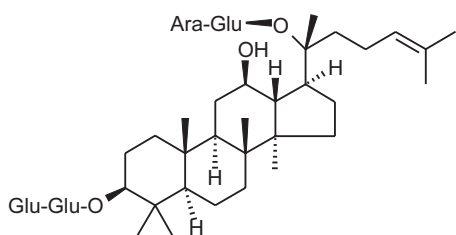
Vliv zeleného čaje na GJIC byl rovněž studován *in vivo*³⁸. Modelovým tumorovým promotorem byl v tomto případě pentachlorfenol (PCP), který byl aplikován myším po dobu 2 týdnů. PCP způsobuje oxidační poškození jaterní DNA spojené s redukcí počtu konexinů 32 v jaterní tkáni. Extrakt ze

zeleného čaje byl myším aplikován v infuzi po dobu 3 týdnů. Současná aplikace PCP a čajového extraktu vykazovala nižší inhibici mezibuněčné komunikace. Autoři se též domnívají, že inhibice mezerových spojů může být vyvolána oxidačním stresem způsobeným PCP a aplikace antioxidantů tak chrání konexiny před oxidačním poškozením.

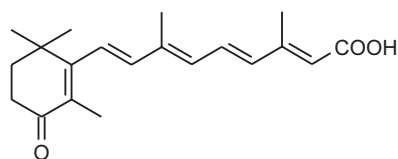
V současnosti je velice diskutovanou látkou *trans*-resveratrol (V). Jde trihydroxystilben patřící mezi rostlinné fytoalexiny. Vyskytuje se ve vysoké koncentraci v oplodí hroznů révy vinné (*Vitis vinifera*), řadě druhů zeleniny a ořechách. Vykazuje silné antioxidační a antimutagenní účinky, působí protizánětlivě, zabráňuje agregaci trombocytů⁵⁰. Antikancerogenní efekt je způsoben inhibicí celé řady markerů účastnících se procesu kancerogeneze⁵¹. Resveratrol blokuje proliferaci promyelomatózní buněčné linie HL-60 a indukuje diferenciaci myelomonocytárního fenotypu. Inhibuje několik biomarkerů indukovaných PMA jako je proteinkinasa C, inhibuje cyklooxygenasu-2 a vyvolává tvorbu volných radikálů v nádorových buňkách HL-60 (cit.⁵²). Resveratrol je silným inhibitorem cytochromu P450 (izoformy 1A1) zodpovědného za oxidativní metabolismus mnoha kancerogenů. Indukuje enzymy II. fáze detoxikace jako jsou NAD(P)H nebo chinonoxidoreduktasa⁵³. Vliv resveratrolu na GJIC byl sledován v nenádorové buněčné linii WB-F344 *in vitro*. Uzavření mezerových spojů bylo vyvoláno dvěma typy promotorů kancerogeneze PMA, jak už bylo zmíněno; jeho účinek souvisí s fosforylací konexinu 43 a DDT, který způsobuje snížení hladiny fosforylované formy konexinu 43. Resveratrol v koncentraci nad 10 μM statisticky významně potlačoval inhibici GJIC vyvolanou oběma typy promotorů³².



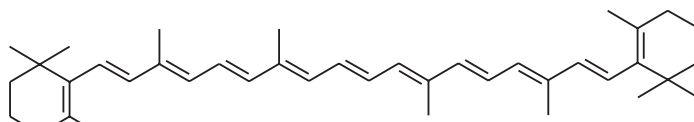
V



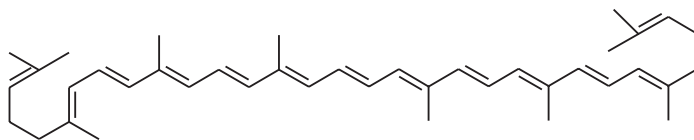
VI



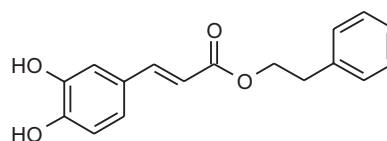
VII



VIII



IX



X

Další látkou přírodního původu, která vykazuje antitumorogenní aktivitu, je ginsenosid Rb₂. Ginsenosidy jsou sekundární metabolity ze skupiny triterpenoidních saponinů, izolované z *Panax ginseng* (Araliaceae). Zejména ginsenosidy Rb₁, Rb₂ či Rc jsou označovány jako antikancerogeny, ale jejich mechanismus účinku nebyl plně objasněn. U celé řady ginsenosidů byl studován vliv na GJIC. Pouze ginsenosid Rb₂ (VI) jevil tumorprotektivní účinek na mezerové spoje inhibované PMA a H₂O₂ v epiteliálních buňkách WB-F344 (cit.³⁴). Naopak řada ginsenosidů např. Rd₂, Rh₂, Ra₁ inhibovala GJIC v lidské endoteliální buněčné linii (HUVEC)³⁵.

Významné antikancerogenní působení vykazují také karotenoidy. Jde o velkou skupinu přírodních lipofilních pigmentů nacházejících se zejména v ovoci, zelenině, léčivých rostlinách, ale sekundárně se vyskytujících i v živočišné říši⁵⁴. V organismu jsou karotenoidy metabolizovány 15,15'-dioxygenasou na retinoidy, rozštěpením dvojné vazby v poloze 15. Jak karotenoidy, tak retinoidy ovlivňují mezibuněčnou komunikaci skrze mezerové spoje⁵⁵. Strukturně rozdílné karotenoidy mají rozdílné účinky na GJIC. Karotenoidy s šestičlenným kruhem jsou obvykle dvakrát aktivnější než jejich pětičlenné analogy. Poloha a charakter substituentů na šestičlenném kruhu se zdají mít malý vliv na jejich aktivitu⁵⁶.

Zhang a spol.⁴³ testovali vliv karotenoidů na chemicky indukovanou neoplastickou transformaci v myších fibroblastech 10T1/2. Nejsilnější stimulace GJIC se projevila u α -tokoferolu, ale také u β -karotenu, kanthaxanthinu, luteinu, lykopenu a α -karotenu.

Studie Stahla a Siese³⁷ potvrzuje stimulační účinek β -karotenu, kanthaxanthinu a navíc připojují echinenon, kryptoxanthin a 4-hydroxy- β -karoten jako schopné induktory GJIC v myších fibroblastech. Zejména kanthaxanthin, nacházející se v mořských plodech a některých houbách, a jeho rozkladné produkty (zejména kyselina 4-oxoretinová, VII), stimulují GJIC a expresi konexinu 43 mRNA⁴⁰. Další práce poukazuje zvláště na lykopen obsažený v rajčatech, melounech a rostlinných olejích jako potenciální inhibitor nádorového bujení⁵⁷.

Konzumace rajčat a rajčatových produktů byla epidemiologicky spojována s preventivním účinkem proti rakovině prostaty. Studie *in vitro* potvrzují tento předpoklad, lykopen jednak stimuluje mezerové spoje⁴², dále působí na buněčný růst a v kombinaci s α -tokoferolem inhibuje proliferaci buněk karcinomu prostaty⁴⁰.

Vliv některých karotenoidů na mezerové spoje byl testován i *in vivo*. β -Karoten (VIII) a lykopen (IX) účinkovaly v závislosti na dávce. V dávce 50 mg.kg⁻¹ tělesné váhy vyvolávaly inhibici GJIC, zatímco dávka 5 mg.kg⁻¹ vedla ke stimulaci GJIC v jaterní tkáni laboratorních potkanů⁴⁴.

Další látkou přírodního původu, u které byl zjištěn stimulační efekt na GJIC, je 2-fenylethylester kyseliny kávové (X) (CAPE)²⁴. CAPE je aktivní složkou propolisu vykazujícího protizánětlivé, antivirové a antikancerogenní vlastnosti. Byl zjišťován vliv CAPE na tumorové jaterní GJIC-deficientní buňky transformované ras onkogenem (WB-ras2). Výsledky ukazují, že CAPE regeneruje mezerové spoje na základě fosforylace konexinu 43. Normální lokalizace mezerových spojů v plazmatické membráně WB-ras2 buněk byla sledována třetí den po aplikaci této látky v koncentraci 5 μ g.ml⁻¹.

Mezi další biogenní inhibitory promoce kancerogeneze patří také vitamin D₃ (cholecalciferol) stimulující GJIC v liniích lidských kožních fibroblastů 161BR (cit.⁴⁵). Vitamin E (α -tokoferol) brzdí inhibici GJIC navozenou volnými kyslíkovými radikály, DDT, lindanem i fenobarbitalem v jaterních epitelálních buňkách myši a potkanů a děložních myocytech potkanů¹.

5. Závěr

Vzhledem k tomu, že v dnešní době existuje velké riziko vzniku nádorových onemocnění, rozvíjí se snaha o nalezení nových, bezpečných látek s chemopreventivní aktivitou. Pozornost se také obrací do oblasti přírodních látek, z nichž řada má schopnost modulovat GJIC. Stimulace GJIC v nádorových buňkách má několik užitečných terapeutických účinků zahrnujících snížení buněčné proliferace, vzrůst diferenciaci, zvýšení schopnosti apoptózy a též podporu radiační terapie a chemoterapie. I když je zde stále ještě řada nevyřešených otázek, zdá se, že prevence inhibice GJIC může být jednou z možností racionální preventivní terapie nádorového bujení.

LITERATURA

1. Trosko J. E., Ruch R. J.: *Front. Biosci.* 3, 208 (1998).
2. Hofmanová J., Machala M., Kozubík A.: *Folia Biol. (Prague)* 46, 165 (2000).
3. De Maio A., Vega V. L., Contreras J. E.: *J. Cell. Physiol.* 191, 269 (2002).
4. Husoy T., Cruciani V., Sanner T., Mikalsen S.: *Carcinogenesis* 22, 221 (2001).
5. Kidder G. M., Winterhager E.: *Front. Biosci.* 6, 53 (2001).
6. Yamasaki H., Krutovskikh V., Mesnil M., Tanaka T., Zaidan-Dagli M. L., Omori Y.: *C. R. Acad. Sci., Vie Sci.* 322, 151 (1999).
7. Musil L. S., Goodenough D. A.: *Cell* 74, 1065 (1993).
8. Bruzzone R., White T. W., Paul D. L.: *Eur. J. Biochem.* 238, 1 (1996).
9. Jongen W. M. F., Fitzgerald D. J., Asamoto M., Piccoli C., Slaga T. J., Gros D., Takeichi M., Yamasaki H.: *J. Cell Biol.* 114, 545 (1991).
10. Saez J. C., Berthoud V. M., Moreno A. P., Spray D. C.: *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* 27, 163 (1993).
11. Upham B. L., Kang K. S., Cho H. Y., Trosko J. E.: *Carcinogenesis* 18, 37 (1997).
12. Ruch R. J., Klaunig J. E.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 94, 427 (1988).
13. Yamasaki H.: *Mutat. Res.* 365, 91 (1996).
14. Lampe P. D., Lau A. F.: *Arch. Biochem. Biophys.* 384, 205 (2000).
15. Ruch R. J., Trosko J. E.: *J. Cell Biochem.* 83, 163 (2001).
16. Tian W., Zhang Z.: *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 279, 593 (2000).
17. Ren P., Mehta P. P., Ruch R. J.: *Carcinogenesis* 19, 169 (1998).
18. Combes R. D.: *Toxicol. in Vitro* 14, 387 (2000).
19. Warn-Cramer B. J., Cottrell G. T., Burt J. M., Lau A. F.: *J. Biol. Chem.* 273, 9188 (1998).
20. Lau A. F., Kanemitsu M. Y., Kurata W. E., Danesh S., Boynton A. L.: *Mol. Biol. Cell* 3, 865 (1992).
21. Upham B. L., Weis L. M., Trosko J. E.: *Environ. Health Perspect.* 106, 975 (1998).
22. Ruch R. J., Madhukar B. V., Trosko J. E., Klaunig J. E.: *Mol. Carcinog.* 7, 50 (1993).
23. Nicolai S., Sies H., Stahl W.: *Biochem. Pharmacol.* 53, 1553 (1997).
24. Na H. K., Wilson M. R., Kang K. S., Chang C. C., Grunberger D., Trosko J. E.: *Cancer Lett.* 157, 31 (2000).
25. El-Fouly M. H., Trosko J. E., Chang C. C.: *Exp. Cell Res.* 168, 422 (1987).
26. Rivedal E., Mikalsen S. O.: *Toxicol. in Vitro* 14, 185 (2000).
27. Trosko J. E., Chang C. C.: *Mutat. Res.* 480, 219 (2001).
28. Ren P., De Feijter A. W., Paul D. L., Ruch R. J.: *Carcinogenesis* 15, 1807 (1994).
29. Trosko J. E., Goodman J. I.: *Mol. Carcinog.* 11, 8 (1994).
30. Chaumontet C., Bex V., Gaillard-Sanchez I., Seillan-Heberden C., Suschetet M., Martel P.: *Carcinogenesis* 15, 2325 (1994).
31. Chaumontet C., Droumaguet C., Bex V., Heberden C., Gaillard-Sanchez I., Martel P.: *Cancer Lett.* 114, 207 (1997).
32. Nielsen M., Ruch R. J., Vang O.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275, 804 (2000).
33. Sigler K., Ruch R. J.: *Cancer Lett.* 69, 15 (1993).
34. Kang K. S., Kang B. C., Lee B. J., Che J. H., Li G. X., Trosko J. E., Lee Y. S.: *Cancer Lett.* 152, 97 (2000).
35. Zhang Y. W., Dou D. Q., Zhang L., Chen Y. J., Yao X. S.: *Planta Med.* 67, 417 (2001).
36. Krieger T. R., Loch-Carusio R.: *Biol. Reprod.* 64, 537 (2001).
37. Stahl W., Sies H.: *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 68, 354 (1998).
38. Sai K., Kanno J., Hasegawa R., Trosko J. E., Inoue, T.: *Carcinogenesis* 21, 1671 (2000).
39. Albright C. D., Grimley P. M., Jones R. T., Resau J. H.: *Exp. Mol. Pathol.* 72, 62 (2002).
40. Stahl W., Laar J., Martin H.-D., Emmerich T., Sies H.: *Arch. Biochem. Biophys.* 373, 271 (2000).

41. Carystinos G. D., Alaoui-Jamali M. A., Phipps J., Yen L., Batist G.: *Cancer Chemother. Pharmacol.* 47, 126 (2001).
42. Kucuk O., Sarkar F. H., Sakr W., Djuric Z., Pollak M. N., Khachik F., Li Y. W., Banerjee M., Grignon D., Bertram J. S., Crissman J. D., Pontes E. J., Wood D. P.: *Cancer Epidemiol. Biomarkers* 10, 861 (2001).
43. Zhang L. X., Cooney R., Bertram J. S.: *Carcinogenesis* 12, 2109 (1991).
44. Krutovskikh V., Asamoto M., Takasuka N., Murakoshi M., Nishino H., Tsuda H.: *Jpn. J. Cancer Res.* 88, 1121 (1997).
45. Clairmont A., Tessmann D., Stock A., Nicolai S., Stahl W., Sies H.: *Carcinogenesis* 17, 1389 (1996).
46. Surh Y. J.: *Mutat. Res.* 428, 305 (1999).
47. Chaumontet C., Suschetet M., Honikman-Leban E., Krutovskikh V. A., Berges R., Le Bon A. M., Heberden C., Shahin M. M., Yamasaki H., Martel P.: *Nutr. Cancer* 26, 251 (1996).
48. Kuroda Y., Hara Y.: *Mutat. Res.* 436, 69 (1999).
49. Ale-Agha N., Stahl W., Sies H.: *Biochem. Pharmacol.* 63, 2145 (2002).
50. Gehm B. D., McAndrews J. M., Chien P. Y., Jameson J. L.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 14138 (1997).
51. Jang M., Pezzuto J. M.: *Drugs Exp. Clin. Res.* 25, 65 (1999).
52. Jang M., Cai L., Udeani G. O., Slowing K. V., Thomas C. F., Beecher C. W., Fong H. H., Farnsworth N. R., Kinghorn A. D., Mehta R. G., Moon R. C., Pezzuto J. M.: *Science* 275, 218 (1997).
53. Surh Y. J.: *Mutat. Res.* 428, 305 (1999).
54. Mangels A. R., Holden J. M., Beecher G. R., Forman M. R., Lanza E.: *J. Am. Diet. Assoc.* 93, 284 (1993).
55. Teicher V. B., Kucharski N., Martin H.-D., Saag P., Sies H., Stahl W.: *Arch. Biochem. Biophys.* 365, 150 (1999).
56. Stahl W., Ale-Agha N., Polidori M. C.: *Biol. Chem.* 383, 553 (2002).
57. Gerster H.: *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 63, 93 (1993).

Seznam zkratek

Ara	arabinoza
CAPE	2-fenylethylester kyseliny kávové
Cx	konexin

DDT	1,1,1-trichlor-2,2-bis(4-chlorofenyl)ethan
DPPD	<i>N,N'</i> -difenyl-1,4-fenylendiamin
ERKs	kinasy regulované mimobuněčnými signály
FRAP	(fluorescence redistribution after photobleaching)
GJIC	(gap junctional intercellular communication) – mezibuněčná komunikace mezerovými spoji
Glu	glukosa
HUVEC	lidská endoteliální buněčná linie
MAPKs	kinasy aktivované mitogeny
PAHs	polycyklické aromatické uhlovodíky
PCP	pentachlorfenol
PKC	proteinkinasa C
PMA	forbol-12-myristát-13-acetát
RT-PCR	reverzně transkripční polymerasová řetězová reakce
SL/DT	(scrape loading/dye transfer)

H. Forejtníková and R. Kubínová (*Department of Natural Drugs, Faculty of Pharmacy, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno*): **Natural Compounds as Stimulators of Gap-junctional Intercellular Communication**

Both epigenetic and mutagenic events influence the process of carcinogenesis. Any mutagenic event irreversibly alters the genomic information of the cell. Epigenetic activities of compounds do not damage genes directly, but they can alter the gene expression. The most important consequences include alteration of cell proliferation, differentiation, or apoptosis. One of them, which apparently link to the promotion of carcinogenesis is the inhibition of gap-junctional intercellular communication (GJIC) in vitro. These gap junctions allow ions and low-molecular-weight molecules to move between coupled cells, thereby facilitating synchronization of electrotonic or metabolic cooperation. Transient down-regulation by endogenous or exogenous chemicals can bring about adaptive or maladaptive consequences depending on circumstances. Tumor promoters (e.g. DDT) and growth factors reduce GJIC, whereas anticarcinogens and growth inhibitors (e.g., flavonoids, resveratrole, carotenoids) enhance GJIC. Prevention of inhibition of GJIC could be an important chemopreventive strategy of cancer therapy.

UNIKÁTNE LIPIDY A ŠTRUKTÚRY MEMBRÁN ARCHAEBAKTÉRIÍ

LUBOMÍRA ČUBOŇOVÁ a PETER ŠMIGÁŇ

Ústav biochémie a genetiky živočíchov, Slovenská akadémia vied, Moyzesova 61, 900 28 Ivanka pri Dunaji, Slovenská republika

Lubomira.Cubonova@savba.sk

Došlo 24.7.02, prepracované 26.9.03, prijaté 30.9.03.

Kľúčové slová: Archaea, membránové lipidy, membránové proteíny, štruktúra membrán, archaeozómy

Obsah

1. Úvod
2. Chemické zloženie membrán
 - 2.1. Membránové lipidy
 - 2.1.1. Polárne membránové lipidy
 - 2.1.2. Neutrálne lipidické komponenty membrán
 - 2.2. Membránové proteíny
3. Molekulová organizácia archaeobakteriálnych biomembrán
4. Vplyv zloženia membrán na ich funkciu
5. Archaeozómy
6. Záver

1. Úvod

Biologické membrány sú predmetom veľkého záujmu bádateľov, nakoľko sú s nimi úzko späté mnohé, životne dôležité procesy, ako je transport látok, transformácia energie, regulácia metabolizmu, koordinácia biologických procesov či bunková diferenciácia.

Počas evolúcie sa každý živý systém vyvíjal a prispôboval zmenám a existencii v novom prostredí. Aj v prípade bunkových membrán dochádzalo počas tohto procesu nielen k veľkým štruktúrnym zmenám, ale i významným zmenám ich funkcie.

Viditeľné znaky prispôsobenia sa organizmu nehostiným a často extrémnym podmienkam prostredia možno doteraz pozorovať u organizmov, ktoré patrili k jedným z prvých obyvateľov Zeme, u Archaea (archaeobaktérie). Extrémne teploty a hodnoty pH, vysoká koncentrácia solí či striktná anaerobióza boli nesporne dôvodom toho, že tieto najstaršie prežívajúce organizmy sú vybavené nezvyčajnými komponentami a jedinečnými biologickými procesmi. Na základe týchto špecifických vlastností, Woese a Fox v roku 1977 zaradili Archaea k tretej, samostatnej ríši, odlišnej od Baktérií a Eukaryotov¹. Prevažnú väčšinu Archaea

tvoria predstavitelia troch základných fenotypických skupín: halofily, metanogénne baktérie a termoacidofily. Ich významným spoločným menovateľom je, že sa nachádzajú v extrémnych ekologických podmienkach².

Jedným z najdôležitejších biochemických rysov Archaea je okrem iného, aj unikátne lipidické zloženie a z toho odvodená špecifická štruktúra membrány, čo tiež slúži ako prioritný taxonomický znak tejto skupiny mikroorganizmov.

Štúdium archaeobakteriálnych membrán otvára nové, fascinujúce a doposiaľ nevyriešené problémy membranológie. Je možné predpokladať, že zavedenie metód molekulyvej biológie, ktoré zatiaľ v Archaea nie sú uspokojivo aplikovateľné, prinesie mnohé významné objavy z teoretického, ale i praktického hľadiska.

2. Chemické zloženie membrán

Základnými zložkami všetkých bunkových membrán sú molekuly bielkovín a lipidov. Mnohé membrány obsahujú menšie množstvo sacharidov vo forme glykoproteínov a glykolipidov a určitý podiel sterolov a iných zložiek lipidických vlastností³.

Archaeobakteriálne membrány sa výrazne odlišujú od membrán baktérií aj eukaryotov, a to nielen zložením a fyzikálno-chemickými vlastnosťami jednotlivých zložiek, ale aj ich vzájomným usporiadaním. Jedinečné membránové lipidy prispievajú Archaea k možnosti existovať v extrémnych podmienkach.

2.1. Membránové lipidy

Podstatnú časť lipidov, nachádzajúcich sa v biomembránach eukaryotov, tvoria fosfoglyceridy, sfingofosfolipidy (klasifikované ako fosfolipidy) a cholesterol. U fosfoglyceridov je hydrofóbná časť tvorená masťnými kyselinami s rôznou dĺžkou reťazca a stupňom nasýtenia, naviazanými esterovou väzbou na glycerol. U sfingofosfolipidov je glycerol nahradený sfingozínom. Rôzne membrány sa líšia zastúpením jednotlivých amfifilných lipidov, ako aj ich pomerom k lipidom neutrálnym³⁻⁵.

Základné rozdiely medzi lipidickým zložením membrán u baktérií, eukaryotov a u Archaea možno zhrnúť nasledovne:

1. Rozdielny charakter uhľovodíkových reťazcov. Kým baktérie a eukaryoty obsahujú masťné kyseliny s rôznym stupňom nasýtenia, u Archaea nachádzame silne metylované izoprenoidné reťazce.
2. Rozdielny charakter väzby medzi glycerolom a masťnými kyselinami resp. izoprenoidnými reťazcami. U baktérií a eukaryotov sa jedná o esterovú väzbu ($-\text{CH}_2-\text{OCOR}$), u Archaea o éterovú väzbu ($-\text{CH}_2\text{OR}$). Výnimku tvoria plazmalogény u eukaryotov, kde sa tiež vyskytuje éterová väzba.

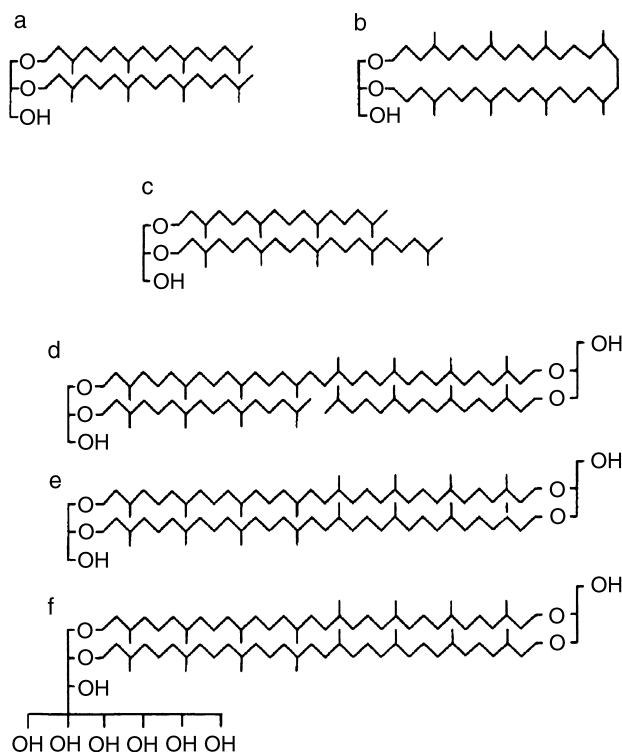
3. Ďalšou zvláštnosťou u Archaea je to, že izoprenoidy sú vo fosfolipidoch membrán viazané v pozíciách *sn*-2,3 na fosfoglycerolovú kostru, zatiaľ čo u baktérií a eukaryotov sú masné kyseliny viazané na fosfoglycerolovú kostru fosfolipidov v pozíciách *sn*-1,2.
4. Z hľadiska štruktúry membrány je pozoruhodné, že u Archaea sa zistila prítomnosť tetraéterových lipidov typu 2,2',3,3'-tetra-*O*-bisfytandiyl-*sn*-diglycerol. Podrobnosti budú uvedené ďalej^{3,6}.

Prítomnosť éterových lipidov v membránach extrémnych halofilov bola objavená v roku 1978 (Kates a spol. identifikovali glycerol-diéterové lipidy u *Halobacterium cutirubrum*)⁷. Neskôr sa ukázalo, že unikátnosť archaeobakteriálnych lipidov je jedným z faktorov, ktoré umožňujú zaradenie týchto organizmov do samostatnej ríše. Analýza polárnych lipidov sa stala bežne používanou metódou pri klasifikácii a druhovom zatriedení nových izolátov archaeobaktérií⁸.

80–95 % membránových lipidov archaeobaktérií tvoria polárne éterové lipidy a 5 – 20 % neutrálne skvalény (C₃₀) a iné izoprenoidy⁹.

2.1.1. Polárne membránové lipidy

Polárne archaeobakteriálne lipidy pozostávajú z glycerol-éterovej časti, na ktorú sú naviazané polárne „hlavičky“.



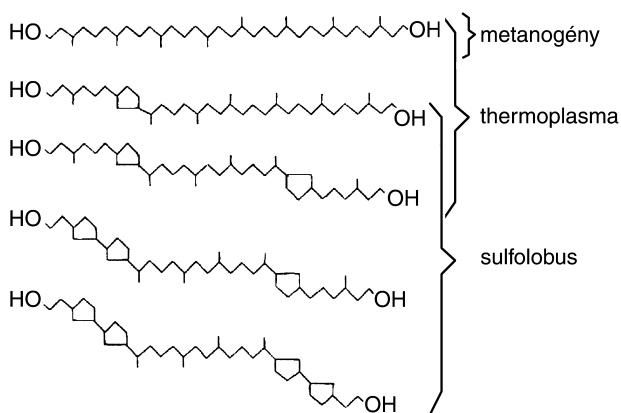
Obr. 1. Membránové lipidy archaeobaktérií. a) fytanyl-diéter, b) bifytanyl-diéter (makrocyclic), c) fytanyl/sesterterpanyl-diéter, d) bifytanyl/fytanyl/fytanyl/diglycerol-tetraéter, e) bisfytandiyl/diglycerol-tetraéter, f) bisfytandiyl/nonitolglycerol-tetraéter¹¹

Tieto sú tvorené organickými fosfátovými esterami alebo sacharidovými zvyškami, podobné baktériám a eukaryotom.

Na základe éterových „chvostíkov“ rozoznávame u archaeobaktérií tzv. archaeolové a caldarchaeolové lipidy (ďalej diéterové a tetraéterové lipidy)⁶.

Diéterové lipidy predstavujú C_{20,20}-diétery (ide o 2,3-di-*O*-difytanyl-*sn*-glycerol, označované tiež D_S), v ktorých sú dva uhľovodíkové reťazce éterovou väzbou viazané na glycerol v polohe *sn*-2,3^{10,11} (obr. 1a). Extrémne halofily obsahujú okrem C_{20,20}-diéterov aj variabilné množstvá C_{20,25}-diéterov (obr. 1c) a C_{25,25}-diéterov¹¹. V membránach metanogénov *Methanococcus jannaschii* sa dokázala makrocyclická forma diéterových lipidov¹¹ (obr. 1b). Charakteristickou črtou niektorých metanogénov je i výskyt hydroxylovaných diéterov, v ktorých je na 3 uhlíku *sn*-2 alebo *sn*-3 alkylového reťazca naviazaná OH skupina¹⁰.

Tetraéterové lipidy predstavujú C_{40,40}-tetraétery (2,2',3,3'-tetra-*O*-bisfytandiyl-*sn*-diglycerol, označované T_S). Je to jedinečná forma lipidov, ktorej existencia bola dokázaná len u archaeobaktérií. Tetraéterové lipidy sú diméry, ktoré vznikajú kondenzáciou dvoch diéterových lipidov a väčšinou obsahujú dve oproti sebe stojace molekuly glycerolu spojené 40-uhlíkovými bisfytandiyllovými reťazcami (obr. 1e). Vo všeobecnosti ich možno nájsť u termoacidofilov, extrémnych termofilov a metanogénov. Doposiaľ ne-



Obr. 2. Štruktúra bifytanylových reťazcov tetraéterových lipidov a ich distribúcia v rámci Archaea. Termofilné archaeobaktérie rodov Sulfolobus a Thermoplasma môžu v reťazci obsahovať 1 až 4 cyklopentánové kruhy²

boli dokázané u extrémnych halofilov. U niektorých Archaea sa v malých množstvách vyskytujú aj tetraétery, ktoré obsahujú jeden C₄₀ fytanylový reťazec a dva C₂₀ fytanylové reťazce, u ktorých nedošlo ku kondenzácii a nevytvorili druhý C₄₀ reťazec¹¹ (obr. 1d). Špecifikom termoacidofilov rodu Sulfolobus je výskyt nonitolglycerol-tetraéterov s 9-uhlíkovým alkoholom nonitolom, ktorý nahrádza jednu molekulu glycerolu v štruktúre tetraéteru¹¹ (obr. 1f). Typickou vlastnosťou termofilov je prítomnosť 1 až 4 cyklopentánových kruhov v bifytanylových reťazcoch² (obr. 2).

2.1.2. Neutrálne lipidické komponenty membrán

Ďalšie významné zložky membrán predstavujú neutrálne lipidy, ktoré sú u eukaryotov reprezentované hlavne sterolmi.

Keďže membrány prokaryotických buniek neobsahujú steroly, predpokladá sa, že u prokaryotov sa v dôsledku neprítomnosti kyslíka v atmosfére, evolúcia sterolov zastavila na úrovni skvalénu. Prokaryotické bunky si však aj za anaeróbných podmienok dokázali zo skvalénu nasyntetizovať štruktúrne a funkčné ekvivalenty sterolov, tzv. hopanoidy. Hopanoidy sú, podobne ako steroly, päťcyklické uhľovodíky s rôznym počtom nasubstituovaných OH skupín. Dokázalo sa, že sa vo zvýšenej miere vyskytujú najmä u acidofilov a v membránach tvoriacich veľký protónový elektrochemický gradient³.

Neutrálne lipidy Archaea sú zastúpené najmä C₃₀ izoprenoidmi (skvalénmi), ale aj inými izoprenoidnými uhľovodíkmi. Archaeobakteriálne neutrálne lipidy, ale aj fytylanové refazce ich polárnych lipidov, majú v podstate rovnaký izoprénový štruktúrny základ, ako eukaryotické steroly či prokaryotické hopanoidy. Predpokladá sa, že tieto látky majú v membránach Archaea podobnú funkciu, ako steroly v membránach eukaryotov a hopanoidy v membránach prokaryotov^{11,12}.

2.2. Membránové proteíny

Membránové proteíny majú okrem štruktúrnej, aj mnohé špecifické enzymatické funkcie v transporte látok cez membránu, ale i vo vnútri bunky, v prenose informácie prostredníctvom receptorov a iné. Zdá sa pravdepodobné, že variabilita membrány archaeobaktérií v zložení lipidov zodpovedá aj variabilita v zložení proteínov. V tejto súvislosti sú zaujímavé najmä proteíny, ktoré sa podieľajú na transporte látok cez membrány.

Napriek odlišnej štruktúre lipidov v membránach Archaea, membránové transportné kanály sú veľmi podobné bakteriálnym a eukaryotickým. Sú tvorené polypeptidovým refazcom, ktorý je v membráne ukotvený pomocou jedného alebo viacerých transmembránových úsekov so štruktúrou α -helixu¹³.

Vzhľadom na fylogenetické postavenie archaeobaktérií je zaujímavá i komplexita elektrón-transportného systému. Predpokladalo sa totižto, že archaeobakteriálne cytochrómy a respiračné enzýmy by mali mať oveľa jednoduchšiu štruktúru, ako ich bakteriálne či eukaryotické ekvivalenty. Ukázalo sa však, že u viacerých Archaea dochádza ku vzniku neobvyklých asociácií medzi cytochrómami a inými respiračnými proteínmi za vzniku tzv. superkomplexov¹⁴⁻¹⁶.

Vplyvom extrémnych životných podmienok sa počas evolúcie vytvorili už u Archaea viaceré adaptačné mechanizmy, ktoré zahŕňajú i zmeny v charaktere membránových proteínov. Ide hlavne o ovplyvnenie celkového náboja proteínu, zmeny v charaktere väzieb v rámci proteínu ako i interakcií proteínu s inými molekulami, či zmeny v procese samotného skladania proteínu¹⁷.

Doposiaľ nie je úplne objasnený spôsob, akým dokážu niektoré extremofilné Archaea predchádzať degradácii aminokyselín, nakoľko mnohé z týchto aminokyselín majú za extrémnych teplôt polčas života kratší, ako je generačná doba termofilu. Existuje viacero možností; môže ísť napr. o modifikácie aminokyselín, ktoré bránia ich degradácii (deaminácia, β eliminácia, oxidácia, hydrolýza a iné), ďalej o využívanie špecifických ochranných látok, alebo dochádza vo zvýšenej miere k samotnej syntéze aminokyselín¹⁷.

Membránové proteíny Archaea sú v súčasnosti predmetom záujmu mnohých pracovných skupín. Ich snahou je identifikovať spôsob, akým si z nášho pohľadu aj za extrémnych podmienok, archaeobakteriálne proteíny dokážu udržiavať svoju stabilitu. Výsledky doterajších experimentov priniesli niekoľko možných mechanizmov tohto prispôbenia sa. Analýzou proteínov niektorých termofilov sa zistilo, že majú znížený obsah glycínu a znížený pomer povrchu proteínu k jeho objemu. Dokázalo sa, že k zvýšeniu stability proteínov u termofilov môže prispieť zväčšenie množstva slabých interakcií (vodíkových mostíkov, iónových a hydrofóbných väzieb) v rámci proteínu, obzvlášť ale vytváranie iónových párov^{18,19}. Mnohé proteíny extrémnych halofilov obsahujú väčší podiel kyslých aminokyselín a menšie množstvo zásaditých aminokyselín¹⁸.

Záujem o tieto skupiny proteínov je jasný, pretože poznanie ich zloženia a štruktúry môže mať významné biotechnologické aplikácie. Súčasné trendy v spoznávaní kompletných genómových sekvencií a ich funkčná analýza u Archaea vytvárajú dobré predpoklady na to, aby sa v rámci komparatívnej genetiky a proteomiky dali rozpoznať princípy vedúce k rozdielom medzi membránovými proteínmi Archaea, baktérií a eukaryotov. Treba podotknúť, že v súčasnosti sú naše znalosti archaeobakteriálnych membránových proteínov len obmedzené.

3. Molekulová organizácia archaeobakteriálnych biomembrán

Všetky doposiaľ študované membrány z eukaryotických alebo z prokaryotických buniek majú v podstate podobné zloženie, a sú aj veľmi podobné v štruktúrnej organizácii.

Bunkové membrány sú supramolekulárne štruktúry, ktorých základnou zložkou je fosfolipidová dvojvrstva. Dvojvrstva má vnútornú a vonkajšiu stranu, a molekuly lipidov sú v nej orientované tak, že hydrofóbné refazce smerujú do stredu a polárne skupiny na povrch dvojvrstvy. Časť povrchu pokrývajú periférne proteíny, ktoré sa dajú z membrány relatívne ľahko uvoľniť. Integrované proteíny môžu byť ponorené vo fosfolipidovej dvojvrstve rozlične hlboko³.

Jednotlivé štruktúrne elementy biologickej membrány sú spolu viazané hydrofóbnymi a elektrickými interakciami ako aj van der Waalsovými silami. Navzájom spolu geometricky a termodynamicky interagujú². Elektrostatickými silami sa môžu spolu viazať polárne skupiny fosfolipidov s polárnymi skupinami bielkovín, ale rozhodujúcou silou, ktorá drží membránové kontinuum pospolu, je práve hydro-

fóbná väzba, ktorá sa vytvára medzi uhľovodíkovými reťazcami membránových lipidov a transmembránovými úsekmi membránových proteínov²⁰.

Z tohto hľadiska bolo prekvapujúce zistenie, že membrány Archaea sa chemicky zásadne odlišujú od membrán prokaryotov a eukaryotov.

Archaea dokázali prispôsobiť zloženie, ale i štruktúru membrány podmienkam vonkajšieho prostredia. Účelom bolo udržanie membránovej fluidity, ktorej kvapalno-kryštalický stav závisí od teploty, charakteru alkánových reťazcov, pH či prítomnosti divalentných iónov²¹.

Jedinečné zloženie a štruktúra lipidov v membránach Archaea zabezpečuje jej optimálnu funkčnosť.

Diéterové lipidy archaeobaktérií sú schopné vytvárať „klasickú“ lipidickú dvojvrstvu vďaka interakciám oproti sebe orientovaných fytylylových reťazcov.

Dĺžka fytylylového reťazca je zhodná s dĺžkou reťazca mastných kyselín u „klasických“ lipidov baktérií a eukaryotov, a tak i celková hrúbka dvojvrstvy je podobná^{10,22}.

Zvláštnosťou Archaea je však membrána zložená z tetraéterových lipidov, prípadne zo zmesi diéterových a tetraéterových lipidov. Lipid zložený z diglyceroltetraéteru má dve polárne skupiny a aj svojou dĺžkou spĺňa predpoklady na to, aby prestúpil archaeobakteriálnu membránu po celej jej hrúbke, a tak dokázal nahradiť obe polovice „klasickú“ lipidickú dvojvrstvu. Tento zaujímavý fakt bol základom fyzikálno-chemických experimentov, ktoré potvrdili, že v prítomnosti tetraéterov môže archaeobakteriálna membrána existovať vo forme „monovrstvy“. Monovrstva je tvorená tetraéterom, ktorého dve polárne skupiny nachádzajúce sa oproti sebe, vytvárajú dve opačné strany membrány^{10,22}. U metanogénov a termoacidofilov, u ktorých sú membránové lipidy tvorené zmesou diéterov a tetraéterov, sa môže aj membrána nachádzať vo forme zmesi monovrstvy a dvojvrstvy¹⁰.

4. Vplyv zloženia membrán na ich funkciu

Alkylová éterová štruktúra dodáva stabilitu lipidom v prostredí s extrémnymi hodnotami pH. Netypická konfigurácia zvyšuje rezistenciu lipidov voči fosfolipázam²³. Tetraéterové lipidy svojim usporiadaním v membráne ovplyvňujú pohyb menších susediacich molekúl a pôsobia i na celkovú vertikálnu stabilitu dvojvrstvy²⁴.

Optimálnou rastovou teplotou značného množstva Archaea organizmov je teplota väčšia ako 45 °C. Predpokladá sa, že kvapalno-kryštalický stav membrány v prostredí s vysokými teplotami pomáhajú udržiavať aj rozvetvené izoprenoidné reťazce diéterových a tetraéterových lipidov. Rast v prostredí s vysokými teplotami vyžaduje nielen tepelnú stabilitu enzýmov a iných makromolekúl, ale aj určité obmedzenia v membránovej permeabilite. Pri vysokých teplotách sa vo všeobecnosti zvyšuje rýchlosť chemických reakcií. To sa týka aj pohybu iónov cez membrány. Ak spriahajúci (coupling) ión (protón alebo sodný ión) nešpecificky difunduje príliš rýchlo, organizmus si nie je schopný vytvoriť adekvátny elektrochemický gradient tohto iónu cez

membránu, ktorý je dôležitý z bioenergetického hľadiska. V membránach, zložených z tetraéterových lipidov, je protónová permeabilita limitovaná, čo umožňuje termofilným Archaea udržiavať stabilnú protónmotívnu silu^{25,26}.

Za účelom vytvárania optimálneho elektrochemického potenciálu protónov cez membrány sú mnohé baktérie a väčšina Archaea schopné meniť a prispôbovať lipidické zloženie svojej membrány. Tento jav sa nazýva „homeoprotónová permeabilná adaptácia“^{25,26}.

U metanogénov môže byť výskyt archaeobakteriálnych lipidov výhodou v prostredí s vysokými koncentraciami metánu, ktorý má na klasickú bunkovú membránu nepriaznivý rozpúšťací vplyv²³.

5. Archaeozómy

Lipozómy sú umelé sférické uzatvorené vezikuly, ktoré sú tvorené jednou alebo viacerými fosfolipidovými dvojvrstvami a je v nich zachovaná bariérová schopnosť membrány.

V súčasnosti sa lipozómy využívajú nielen ako umelé membránové modely pri získavaní nových poznatkov o transporte látok, transportných mechanizmoch a funkciách zabudovaných proteínov, ale nachádzajú stále väčšie využitie aj v medicíne a farmácii. Pri pokusoch o ich aplikáciu v živých systémoch však často nie sú schopné odolávať vysokej teplote pri sterilizácii, kyslým hodnotám pH v žalúdku, či koncentrácii solí v močovom mechúre, ktoré spôsobujú napríklad zvýšenú agregáciu vezikúl, hydrolýzu fosfolipidov alebo nežiadúce uvoľnenie prenášanej látky²⁷⁻²⁹.

Niektoré „nedostatky“ klasických lipozómov úspešne pomáha riešiť využívanie archaeobakteriálnych lipidov a tzv. archaeozómov.

Sú to lipozómy pozostávajúce výlučne z archaeobakteriálnych lipidov, alebo sa tieto nachádzajú v zmesi s inými esterovými lipidmi. Doterajšie experimenty preukázali, že archaeozómy tvorené polárnymi archaeobakteriálnymi lipidmi sú relatívne stabilnejšie ako klasické lipozómy. Ide najmä o stabilitu voči zmenám pH, vysokej teplote, zvýšenej koncentrácii žľčových solí, účinku fosfolipáz, sú stabilnejšie i po dlhšom skladovaní na vzduchu. Stupeň stability závisí od zdroja polárnych lipidov^{10,27,30}.

Archaeozómy, pripravené z vybraných archaeobakteriálnych lipidov, i po tepelnej sterilizácii v autokláve nepodliehajú fúzií či agregácii jednotlivých vezikúl, ktorá je v tomto prípade problémom klasických lipozómov. Takto si archaeozómy aj pri vysokej teplote dokážu udržať zabudovanú prenášanú látku. Zvýšený záujem o archaeozómy podnietila aj ich schopnosť interagovať s fagocytujúcimi bunkami niekoľko násobne intenzívnejšie ako konvenčné lipozómy, čím sa otvorili nové možnosti použitia ich adjuvantnej schopnosti pri príprave vakcín^{30,31}.

Predpokladá sa, že archaeozómy, podobne ako lipozómy, pomôžu v budúcnosti vyriešiť ešte mnoho nezodpovedaných otázok spojených s existenciou samotných archaeobaktérií. Nesporne nájdú využitie aj ako proteolipozómy pri štúdiu transportu látok cez archaeobakteriálne membrány a spôsobu zabudovania a funkcie membránových proteínov.

6. Záver

Cieľom tejto práce bolo ukázať, čím sa Archaea výrazne odlišujú od ostatných organizmov, z hľadiska membrán. Archaeobaktérie sú však charakteristické nielen unikátnym zložením bunkových membrán a povrchových obalov, ale zároveň obsahujú radu enzýmov a biochemických komponentov nezvyčajných vlastností. V ich bunkách prebiehajú jedinečné metabolické procesy a navyše majú rozdielny genetický a proteosyntetický aparát.

S existenciou Archaea sa doposiaľ spája množstvo nezodpovedaných otázok. Dôvodom je i to, že ich izolácia a kultivácia prináša aj v súčasnosti mnohé experimentálne ťažkosti. Spoznávanie pozoruhodných vlastností týchto organizmov má však obrovský význam. Štúdium biochemickej, genetickej a molekulárno-biologickej podstaty Archaea môže nielen pomôcť porozumieť procesu bunkovej evolúcie, ale nadobudne určite význam i pri ich ďalšej biotechnologickej aplikácii.

Autori práce ďakujú za finančnú podporu VEGA finančným grantom 2/7134/20. Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu vedy a techniky prostredníctvom finančnej podpory č. APVT -51-016502.

LITERATÚRA

1. Woese C. R., Fox G. E.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 5088 (1977).
2. Langworthy T. A., Tornabene T. G., Holzer G.: Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. C 3, 228 (1982).
3. Ferencík M., Škárka B., Novák M., Turecký L.: *Biochémia*. Slovak Academic Press, Bratislava 2000.
4. Šubík J.: Chem. Listy 65, 180 (1971).
5. Hayes J. M.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97, 14033 (2000).
6. Koga Y., Nishihara M., Morii H., Akagawa-Matsushita M.: Microbiol. Rev. 57, 164 (1993).
7. Kates M.: Prog. Chem. Fats Lipids 15, 301 (1987).
8. Ross H. N. M., Grant W. D., Harris J. E., v knihe: *Chemical Methods in Bacterial Systematics* (Goodfellow M., Minnikin D. E., ed.), str. 289. Academic Press, New York 1985.
9. Sprott G. D.: J. Bioenerg. Biomembr. 24, 555 (1992).
10. Patel B. P., Sprott G. D.: *Encyclopedia of Life Sciences*. Macmillan Publishers, London 2001.
11. Langworthy T. A., Pond J. L.: Syst. Appl. Microbiol. 7, 253 (1986).
12. Haines T. H.: Prog. Lipid Res. 40, 299 (2001).
13. Saier M. H., Jr.: J. Membr. Biol. 175, 165 (2000).
14. Schäfer G., Engelhard M., Müller V.: Microbiol. Mol. Biol. Rev. 63, 570 (1999).
15. Schäfer G., Purschke W., Schmidt Ch. L.: FEMS Microbiol. Rev. 18, 173 (1996).
16. Schütz M., Brugna M., Baymann E. L. F., Huber R., Stetter K. O., Toci G. H. R., Lemesle-Maunier D., Schmidt P. T. Ch., Nitschke W.: J. Mol. Biol. 300, 663 (2000).
17. Jaenicke R., Böhm G.: Curr. Opin. Struct. Biol. 8, 738 (1998).
18. Madigan M. T., Oren A.: Curr. Opin. Microbiol. 2, 265 (1999).
19. Jaenicke R.: FEMS Microbiol. Rev. 18, 215 (1996).
20. Yeagle P. L.: *Horizons in Membrane Biotechnology*. Wiley-Liss, New York 1990.
21. Driessen A. J. M., Van de Vossenberg J. L. C. M., Konings W. N.: FEMS Microbiol. Rev. 18, 139 (1996).
22. Bullock C.: Biochem. Mol. Biol. Educ. 28, 186 (2000).
23. Kates M.: Biochem. Soc. Symp. 58, 51 (1992).
24. Beveridge T. J., Choquet C. G., Patel G. B., Sprott G. D.: J. Bacteriol. 175, 1191 (1993).
25. Van de Vossenberg J. L. C. M., Driessen A. J. M., Konings W. N.: Extremophiles 2, 163 (1998).
26. Albers S. V., Van de Vossenberg J. L. C. M., Driessen A. J. M., Konings W. N.: Front. Biosci. 5, 796 (2000).
27. Choquet Ch. G., Patel G. B., Sprott G. D.: Can. J. Microbiol. 42, 183 (1995).
28. Szoka F., Jr.: Annu. Rev. Biophys. Bioeng. 9, 467 (1980).
29. Yamauchi K., Doi K., Kinoshita M.: Biochim. Biophys. Acta 1283, 163 (1996).
30. Patel G. B., Sprott G. D.: Crit. Rev. Biotechnol. 19, 317 (1999).
31. Sprott G. D., Brisson J. R., Dicaire Ch. J., Pelletier A. K., Deschatelets L. A., Krishnan L., Patel G. B.: Biochim. Biophys. Acta 1440, 275 (1999).

L. Čuboňová and P. Šmigáň (*Institute of Animal Biochemistry and Genetics, Slovak Academy of Sciences, Ivanka pri Dunaji, Slovak Republic*): **Unique Lipids and Structures of Membranes in Archaeobacteria**

The most striking chemical differences between Archaea membrane lipids and lipids of living organisms are as follows. The former contain (1) 2,3-di-*O*-difityanyl-*sn*-glycerol instead of 1,2-diacyl-*sn*-glycerol, (2) ether bonds instead of ester bonds, (3) isoprenoid chains instead of fatty acids, (4) branched isoprenoids. The structure of Archaea membranes is also unique. Lipid vesicles prepared from archaeal lipids (archaeosomes) are more stable than liposomes and are useful for medical and biotechnological applications.

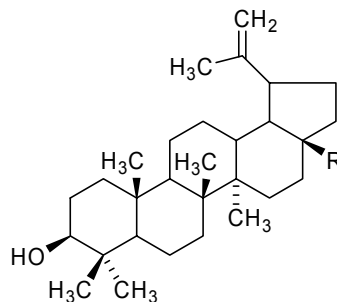
KYSELINA BETULINOVÁ: PERSPEKTIVNÍ CYTOSTATIKUM

JIŘÍ PATOČKA^a a MARIE STIBOROVÁ^b

^a Katedra toxikologie, Vojenská lékařská akademie, Hradec Králové a Katedra radiologie, Zdravotně sociální fakulta, Jihočeská univerzita, České Budějovice, ^b Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta UK, Praha
patocka@pmfhk.cz; stiborova@natur.cuni.cz

Došlo 4.3.03, přepracováno 18.11.03, přijato 24.1.04.

Klíčová slova: pentacyklické triterpeny, betulin, kyselina betulinová, perspektivní kancerostatikum, mechanismus působení, apoptosa, melanom, HIV



kyselina betulinová I, R = COOH
betulin II, R = CH₂OH

1. Úvod

Triterpeny tvoří početnou skupinu přírodních látek, z nichž nejvýznamnější je skupina tetracyklických derivátů odvozených od lanostanu, cykloartanu, dammaranu, euphanu a protostanu a skupina pentacyklických derivátů odvozených od ursanu, oleananu, β-amyrinu, gammaceranu, lupanu a hopanu. Zájem o tyto látky je mimo jiné podmíněn skutečností, že vykazují pestré spektrum biologických aktivit¹. Nacházíme mezi nimi velmi často látky s baktericidním, fungicidním i antivirovým účinkem. Mnohé z nich jsou cytotoxické a mohou být využity v medicíně jako kancerostatika, některé ovlivňují kardiovaskulární systém, jiné zase mají protizánětlivý účinek apod. Triterpeny jsou často účinnými principy léčivých čajů a své místo nachází i v moderní medicíně. Takovým příkladem může být i kyselina betulinová, které je věnován tento článek.

2. Kyselina betulinová

Kyselina betulinová (3β-hydroxylup-20(29)-en-28-ová, I) je krystalická látka o b.t. 279–284 °C (za rozkladu)², špatně rozpustná v ethanolu a acetonu a nerozpustná ve vodě, [α]_D²⁰ + 8,4° (c = 0,83, pyridin)². Byla izolována např. z afrického keře *Ziziphus mauritiana* Lam. (*Rhamnaceae*)³, je však dostupná i z jiných zdrojů, např. z kůry platanu (*Platanus acerifolia*), která vedle kyseliny platanové obsahuje až 2,4 % kyseliny betulinové⁴. Dostupným a levným zdrojem může být i kůra břízy (*Betula alba*, *B. papyrifera*) obsahující betulin (lup-20(29)-en-3β,28-diol, II), který lze snadno oxidací^{5,6} převést na kyselinu I. Betulin byl jednou z prvních přírodních látek, kterou se podařilo získat z rostlin jako čistou chemickou substanci. Byl izolován Löwitsem v roce 1788 sublimací z březové kůry, kde se nachází v množství od 10 do 30 %. Jeho lupanová struktura byla

objasněna v roce 1952. Později byla látka nalezena v celé řadě dalších rostlin. V současné době je betulin získáván ve velkých množstvích jako vedlejší produkt při zpracování březové kůry a nachází uplatnění v řadě aplikací.

2.1. Kyselina betulinová a apoptóza

Zjištění, že kyselina betulinová vyvolává apoptózu bylo publikováno v roce 1995 (cit.⁷). Jde o typ apoptózy vyvolaný přímým účinkem na mitochondrie^{8–10}, nezávisle na akumulaci proteinu p53 a nezávisle na indukovaných systémech ligand/receptor, jako je např. CD95. Účinkem kyseliny betulinové se z mitochondrií uvolňují do cytosolu rozpustné apoptogenní faktory jako je cytochrom c nebo ARF (alternative reading frame), kde aktivují kaspasy^{11,12}.

2.2. Toxikologie kyseliny betulinové

Kyseliny betulinové je prakticky netoxická a tím, že nepůsobí na zdravé buňky a apoptózu vyvolává pouze u buněk rakovinných, je považována za bezpečné léčivo.

2.3. Kyselina betulinová a potlačení růstu melanomů

Kyselina betulinová rovněž vykazuje protinádorovou aktivitu. Nejúčinnější je vůči melanomům¹³. Melanomy jsou nejčastějším druhem kožní rakoviny a např. v USA tímto onemocněním trpí každý devadesátý Američan¹⁴. Ročně je v USA zaznamenáno 800 tisíc nových případů a je to zde nejčastěji se vyskytující druh rakoviny. Podle dosavadních zkušeností je kyselina betulinová selektivním inhibitorem růstu melanomu¹⁵, ale také neuroektodermálních a maligních mozkových tumorů, aniž je toxická pro zdravé buňky¹³. Také některé deriváty kyseliny betulinové vykazují vysokou účinnost proti melanomu, jako např. konjugáty její karboxy-

lové skupiny s aminokyselinami. Tyto konjugáty jsou lépe rozpustné ve vodě a mají vyšší selektivní cytotoxicitu¹⁶. Mechanismus působení proti těmto typům rakoviny vyplývá z výše uvedené indukce apoptózy^{9,10}. Efektivní je kyselina betulinová i v parciální inhibici promoční fáze karcinogeneze¹⁷.

2.4. Kyselina betulinová a inhibice HIV

Kyselina betulinová vykazuje také anti-HIV aktivitu^{18,19}, podobně jako některé její deriváty, a představuje novou skupinu léčiv AIDS²⁰⁻²². Její antivirový účinek spočívá na schopnosti vyvolávat fúzi virových částic tím, že se váže na virový glykoprotein gp41 (cit.²³). Kyselina betulinová tak rozšiřuje spektrum současných léčiv AIDS²⁴.

2.5. Další možnosti uplatnění kyseliny betulinové

Kyselina betulinová byla testována také jako potenciální antimalarikum. *In vitro* vykazovala inhibiční aktivitu proti kmenům *Plasmodium falciparum* senzitivním na chlorochin (T9-96) i rezistentním (K1), ale aktivita *in vivo* na modelu myši malárie (*P. betghei*) byla nízká²⁵. Potenciální využití kyseliny betulinové tkví rovněž v jejím protizánětlivém účinku vyvolaném inhibicí fosfolipasy A (cit.²⁶). Protizánětlivý účinek může vyplývat i z inhibice cyklooxygenasy 1 a 2 (cit.²⁷).

3. Závěr

Předkládaný článek stručně informuje o farmakologických aktivitách přírodního triterpenu kyseliny betulinové a ukazuje, že tato sloučenina je potenciálně velmi vhodným agens k terapii dvou typů často se vyskytujících nádorových onemocnění, maligních melanomů a nádorů mozku. Vzhledem k tomu, že prakticky nevykazuje žádné vedlejší toxické účinky, je uvedená sloučenina vysoce slibná pro klinické použití v humánní medicíně. Vedle potenciálního terapeutického využití, může být použita i k základnímu výzkumu v laboratořích studujících mechanismus apoptózy, jako modelová sloučenina indukující tento proces přímým vlivem na mitochondrie. Pro chemické laboratoře je kyselina betulinová cenným zdrojem inspirace vývoje nových farmakologicky účinných sloučenin na bázi terpenů.

LITERATURA

1. Patočka J.: J. Appl. Biomed. 1, 7 (2003).
2. Seidel V., Bailleul F., Waterman P. G.: Phytochemistry 55, 439 (2000).
3. Simonsen J., Ross W. C. J. (Eds.): *The Terpenes*, sv. V, str. 316. Cambridge Univ. Press, 1957.
4. Dräger B., Galgon T., Neubert R., Wohlrab W.: Ger. Offen. DE 19,713,768; US Patent 6,175,035, 2001.
5. Kim D. S. H. L., Chen Z. D., Nguyen V. T., Pezzuto J. M., Qiu S. X., Lu Z. Z.: Synth. Commun. 27, 1607 (1997).
6. Son L. B., Kaplun A. P., Spilevskii A. A., Andii-Pravdivyi Iu. E., Alekseeva S. G., Gribor'ev V. B., Shvets V. I.: Bioorg. Khim. 24, 7 (1998).
7. Pisha E., Chai H., Lee I. S., Chagwedera T. E., Farnsworth N. R., Cordell G. A., Beecher C. W., Fong H. H., Kinghorn A. D., Brown D. M., Wani M. C., Wall M. E., Hieken T. J., Dasgupta T. K., Pezzuto J. M.: Nat. Med. 1, 1046 (1995).
8. Fulda S., Debatin K. M.: Med. Pediatr. Oncol. 35, 616 (2000).
9. Marchetti P., Mortier L., Beauvillain V., Formstecher P.: Ann. Biol. Clin. 60, 391 (2002).
10. Kwon H. J., Shim J. S., Kim J. H., Cho H. Y., Yum Y. N., Kim S. H., Yu J.: Jpn. J. Cancer Res. 93, 417 (2002).
11. Fulda S., Friesen C., Los M., Scaffidi C., Mier W., Benedict M., Nunez G., Krammer P. H., Peter M. E., Debatin K. M.: Cancer Res. 57, 4956 (1997).
12. Raisova M., Hossini A. M., Eberle J., Riebeling C., Wieder T., Sturm I., Daniel P. T., Orfanos C. E., Geilen C. C.: J. Invest. Dermatol. 117, 333 (2001).
13. Zuco V., Supino R., Righetti S. C., Cleris L., Marchesi E., Gambacorti-Passerini C., Formelli F.: Cancer Lett. 175, 17 (2002).
14. Martinez J. C., Otley C. C.: Mayo Clin. Proc. 76, 1253 (2001).
15. Salti G. I., Kichina J. V., Das Gupta T. K., Uddin S., Bratescu L., Pezzuro J. M., Mehta R. G., Constantinou A. L.: Melanoma Res. 11, 99 (2001).
16. Jeong H. J., Chai H. B., Park S. Y., Kim D. S.: Bioorg. Med. Chem. Lett. 9, 1201 (1999).
17. Akihisa T., Takamine Y., Yoshizumi K., Tokuda H., Kimura Y., Ukiya M., Nakahara T., Yokochi T., Ichiishi E., Nishino H.: J. Nat. Prod. 65, 278 (2002).
18. Fujioka T., Kashiwada Y., Kilkuskie R. E., Cosentino L. M., Ballas L. M., Jiang J. B., Janzen W. P., Chen I. S., Lee K. H.: J. Nat. Prod. 57, 243 (1994).
19. Kashiwada Y., Hashimoto F., Cosentino L. M., Chen C. H., Garrett P. E., Lee K. H.: J. Med. Chem. 39, 1016 (1996).
20. Evers M., Poujade C., Soler F., Ribeill Y., James C., Lelievre Y., Gueguen J. C., Reisdorf D., Morize I., Pauwels R., De Clercq E., Henin Y.: J. Med. Chem. 39, 1054 (1996).
21. Hashimoto F., Kashiwada Y., Cosentino L. M., Chen C. H., Garrett P. E., Lee K. H.: Bioorg. Med. Chem. 5, 2133 (1997).
22. De Clercq E.: Rev. Med. Virol. 10, 255 (2000).
23. Holz-Smith S. L., Sun I. C., Jin L., Matthews T. J., Lee K. H., Chen C. H.: Antimicrob. Agents Chemother. 45, 60 (2001).
24. De Clercq E.: Curr. Med. Chem. 8, 1543 (2001).
25. Steele J. C., Warhurst D. C., Kirby G. C., Simmonds M. S.: Phytother. Res. 13, 115 (1999).
26. Bernard P., Scile T., Didier B., Hibert M., Berthon J. Z.: Phytochemistry 58, 865 (2001).

27. Su B. N., Cuender M., Farnsworth N. R., Fong H. H. S., Pezzuto J. M., Kinghorn A. D.: *Planta Med.* 68, 1125 (2002).

J. Patočka^a and M. Stiborová^b (^a*Department of Toxicology, Military Medical Academy, Hradec Králové and Department of Radiology, Faculty of Health and Social Care, University of South Bohemia, České Budějovice,* ^b*Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague*): **Betulinic Acid: Prospective Cytostatic Agent**

Betulinic acid, a pentacyclic triterpene of the lupane type, is a cytotoxic agent for malignant melanoma. It was identified as a selective inhibitor of melanoma inducing apoptosis by a direct effect on mitochondria independent of accumulation of wild-type p53 protein and independent of death-inducing ligand/receptor systems such as CD95. Mitochondrial perturbations on treatment with betulinic acid resulted in the release of soluble apoptogenic factors such as cytochrome c or alternative reading frame from mitochondria into cytosol, where they induced activation of caspases. Betulinic acid may be a promising new agent in the treatment of neuroectodermal tumors including neuroblastoma.

PŘÍJEM, BIOLOGICKÁ DOSTUPNOST A METABOLISMUS ROSTLINNÝCH POLYFENOLŮ U ČLOVĚKA

JIŘÍ SLANINA A EVA TÁBORSKÁ

Biochemický ústav, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita v Brně, Komenského nám. 2, 662 43 Brno
jslanina@med.muni.cz

Klíčová slova: biologická dostupnost, polyfenoly, flavonoidy, fenolové kyseliny, kvercetin, chlorogenová kyselina, antioxidanty

Obsah

1. Úvod
2. Příjem polyfenolů
3. Resorpce a přeměny polyfenolů v trávicím traktu
 - 3.1. Procesy v tenkém střevě
 - 3.2. Procesy v tlustém střevě
4. Metabolismus polyfenolů po jejich resorpci
5. Analýza a koncentrace polyfenolů a jejich metabolitů v plazmě a moči
6. Biologická dostupnost a antioxidační kapacita plazmy
7. Závěr

1. Úvod

V rostlinách se vyskytují strukturně velmi různorodé fenolové sloučeniny. Vzhledem k jejich širokému rozšíření a vysoké koncentraci v rostlinách jsou běžnou součástí lidské potravy. Nejběžnějšími rostlinnými polyfenoly jsou flavonoidy, fenolové kyseliny a lignany. V současnosti roste zájem o studium těchto přírodních látek, protože jejich příjem v potravě je dáván do souvislosti se snížením výskytu závažných nemocí jako je rakovina a kardiovaskulární choroby. Zvýšený příjem červeného vína, které je zvláště bohaté na polyfenoly, je jedním z pravděpodobných vysvětlení tzv. „francouzského paradoxu“, tedy relativně vysokým obsahem tuků v potravě a nízkou mortalitou na kardiovaskulární onemocnění ve Francii¹. Epidemiologická data upozorňují na korelaci mezi množstvím flavonoidů v potravě a snížením rizika kardiovaskulárních onemocnění, v některých klinických studiích až o více než 50 % (cit.²). Nižší pravděpodobnost nádorových onemocnění u osob, které konzumují více potravin bohatých na polyfenoly, není tak zřejmá a akceptovaná u odborné veřejnosti, jako je tomu u kardiovaskulárních onemocnění. Přesto i zde některé studie naznačují, že příjem potravin obsahující určité polyfenoly, může chránit organismus před některými formami rakoviny, především rakoviny plic³, trávicího traktu^{4,5} a rakoviny prsu u žen a rakoviny prostaty u mužů⁵. Rovněž řada experimentů na laboratorních zvířatech a nádorových buňkách

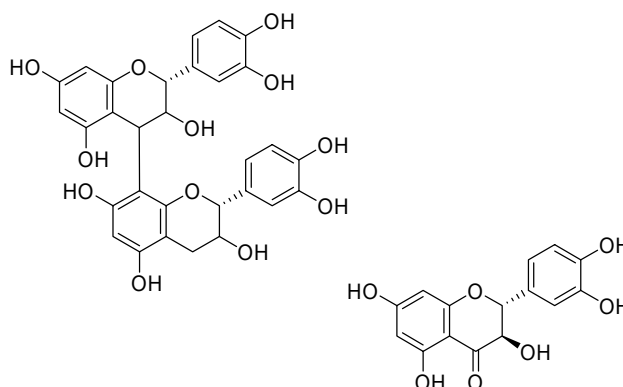
prokázala antikarcinogenní účinky rostlinných polyfenolů.

Předpokládá se, že na protektivním účinku se podílí schopnost rostlinných polyfenolů zhášet reaktivní kyslíkové radikály a omezovat jejich tvorbu chelatací iontů přechodných kovů, především kationtů železa, které jsou schopny generovat vysoce reaktivní hydroxylové radikály. Polyfenoly chrání lipoproteiny o nízké hustotě před oxidační modifikací, která je považována za jeden z klíčových dějů při rozvoji aterosklerózy. Mohou také působit proti vzniku krevních sraženin a tímto způsobem snižovat riziko infarktu myokardu nebo mozkové mrtvice. Mechanismy antiaterogenního působení polyfenolů byly nedávno shrnuty v přehledném článku⁶. Byla navržena řada mechanismů, kterými mohou polyfenoly přítomné v potravě člověka chránit před vznikem rakoviny⁷, zahrnují řadu účinků na úrovni přenosu signálů, které se uplatňují při kontrole buněčného cyklu, apoptózy a angiogenézy. Mohou se uplatnit také antiestrogenní účinky některých tříd polyfenolů, především isoflavonů, lignanů a stilbenů, shrnuté v přehledném článku⁸.

Málo je však známo o tom, zda a v jakém množství jsou rostlinné polyfenoly resorbovány z trávicího traktu člověka, jaké je rozpětí koncentrací v krevní plazmě, jak jsou metabolizovány a vylučovány z organismu. Rovněž znalosti o jejich množství v potravinách nejsou zdaleka kompletní.

2. Příjem polyfenolů

Rostlinné polyfenoly jsou nejrozšířenějšími sloučeninami s redukčními účinky v naší stravě. Jejich denní příjem byl odhadnut na 1 g a je tedy výrazně vyšší než je příjem antioxidačních vitamínů, jako jsou tokoferoly, karoteny nebo askorbová kyselina⁹. Rovněž v testech antioxidační aktivity polyfenoly často předčí vitamíny nebo endogenní antioxidanty jako je např. kyselina močová. Obsah polyfe-



Obr. 1. Strukturní vzorec prokyanidin(4→8)dimeru (proanthokyanidin) a (+)-katechinu (flavanol)

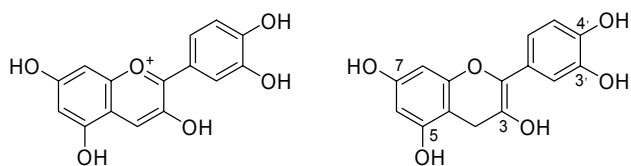
Tabulka I

Orientační obsah polyfenolů v běžně konzumovaném množství některých potravin a nápojů^{9,15,43,44}

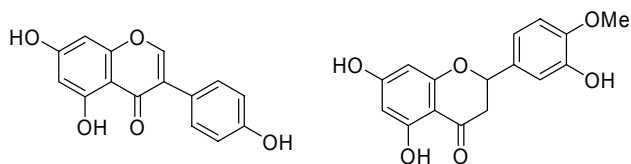
Potravina	Množství potraviny	Obsah polyfenolů		Hlavní polyfenoly
		HPLC	Folinovo činidlo ^a	
Brambory	200 g	30 mg	60 mg	chlorogenová kys.
Rajčata	100 g	10 mg	40 mg	fenolové kyseliny
Jablka	200 g	240 mg	460 mg	proanthokyanidiny
Višně	50 g	280 mg	280 mg ^b	anthokyany
Pšeničná mouka	100 g	75 mg	75 mg ^b	ferulová kyselina
Hořká čokoláda	20 g	100 mg	170 mg	proanthokyanidiny
Červené víno	100 ml	100 mg	200 mg	proanthokyanidiny
Káva	200 ml	150 mg	180 mg	chlorogenová kys.
Černý čaj	200 ml	140 mg	200 mg	katechiny

^a Stanoveno spektrofotometricky pomocí Folinova činidla na základě redukčních vlastností polyfenolů. Obsahy polyfenolů jsou nadhodnoceny u vzorků obsahujících askorbovou kyselinu, případně jiné redukující látky, např. siřičitany (víno).

^b Hodnoty stanovené pomocí Folinova činidla chybí, proto jsou nahrazeny hodnotami získanými pomocí HPLC



Obr. 2. Strukturální vzorec kyanidinu (anthokyanidin) a flavonolu kvercetinu (3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavon)



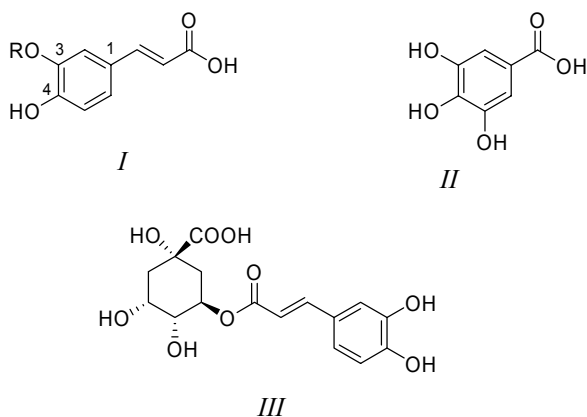
Obr. 3. Strukturální vzorec genisteinu (isoflavon) a hesperetinu (flavanon)

nolů v některých běžně konzumovaných potravinách je uveden v tab. I. Hlavními zdroji polyfenolů jsou především nápoje (víno, káva, čaj, ovocné džusy), čokoláda a ovoce. Celkový obsah polyfenolů v pivě je také vysoký, přibližně 350 mg.l⁻¹, ale část z toho připadá na Maillardovy produkty.

Na celkovém příjmu polyfenolů se flavonoidy podílí asi ze dvou třetin, fenolové kyseliny přibližně jednou třetinou a ostatní polyfenoly (např. lignany^{8,10} a stilbeny¹¹) tvoří minoritní podíl⁹. Flavonoidy můžeme rozdělit do několika

strukturních tříd, v závislosti na oxidačním stavu heterocyklu obsahujícím atom kyslíku (obr. 1 až 3). Biosyntéza flavonoidů byla nedávno uvedena v tomto časopise¹². V rostlinách se flavonoidy vyskytují převážně jako β-glykosidy. Sacharidovou složkou je nejčastěji glukosa nebo rhamnosa, může to být také glukuronová kyselina, galaktosa nebo jiný sacharid. Nejčastěji je připojen jeden glykosyl, někdy však jsou substituovány dva nebo tři hydroxyly polyfenolu. Aglykon nebo sacharidová složka může být dále substituována hydroxykyselinou, např. kyselinou jablečnou nebo galovou.

Z flavonoidů se v potravě nejčastěji vyskytují oligomerní proanthokyanidiny a flavanoly (katechiny), viz obr. 1, průměrný denní příjem každé skupiny převyšuje 100 mg (cit.⁹). Oligomerní proanthokyanidiny, ve kterých je spojeno 2–11 flavanolových jednotek, nejčastěji vazbou C4–C8, mají výrazné adstringentní vlastnosti a vyskytují se zejména v ovoci, čokoládě a červeném víně. Katechiny přijímáme především v čaji, ovoci a čokoládě. Anthokyany (obr. 2) jsou barevné pigmenty ovoce a červeného vína, jejich denní příjem je velmi rozdílný, může dosáhnout až 200 mg (cit.^{9,22}). Flavonoly (obr. 2) se vyskytují v ovoci, zelenině (cibule) i v nápojích (čaj), avšak v poměrně malém množství a tedy jejich denní příjem byl odhadnut pouze na 20 mg (cit.¹³). Přesto patří, především kvercetin a jeho deriváty jako je rutin, k nejčastěji studovaným flavonoidům. Je to dáno jejich komerční dostupností a významnou biologickou aktivitou¹⁴. Rutin se používá jako venofarmakum. Isoflavony (obr. 3) se řadí mezi fytoestrogeny, vyskytují se především v sóji⁸, na celkovém příjmu flavonoidů se podílejí jen z malé části, jejich příjem byl v Japonsku stanoven jen na 30–40 mg.den⁻¹ (cit.⁹). Flavanony z citrusového ovoce



(obr. 3), stejně jako flavony a isoflavony, přispívají k průměrnému dennímu příjmu polyfenolů maximálně několika desítkami miligramů.

Fenolové kyseliny, např. kyselina kávová (*Ia*, R=H), ferulová (*Ib*, R=CH₃) nebo galová (*II*) se nejčastěji nacházejí v rostlinách ve formě esterů, v nichž se váží karboxylem na hydroxylové skupiny organických kyselin nebo sacharidů. Nejběžnější látkou tohoto typu je kyselina chlorogenová (*III*), tedy 5-koфейlchinová kyselina. Kyselina chlorogenová se vyskytuje ve vysokém množství v kávě (50–150 mg v šálku kávy). Konzumenti kávy tak mohou přijímat více fenolových kyselin než flavonoidů. Dále se nachází mimo jiné v bramborách a v mnoha dalších druzích zeleniny a ovoce. Kyselina ferulová je nejčastěji součástí vlákniny, kde je esterovou vazbou vázána na hemicelulose. Kyselina galová se vyskytuje rovněž ve formě esterů, např. v galotaninech je navázána na glukosu¹⁵.

Příznivý vliv rostlinných polyfenolů na zdraví člověka, dokumentovaný jak klinickými studiemi, tak pokusy na zvířatech a buněčných kulturách, podnítl zájem o studium biologické dostupnosti těchto látek. Nové poznatky, v mnohém revidující původní předpoklady, jsou předmětem tohoto sdělení, které je zaměřeno především na biologickou dostupnost a metabolismus glykosidů kvercetinů, jež jsou z flavonoidů nejčastěji studovány, a na chlorogenovou kyselinu, nejrozšířenější fenolovou kyselinu v naší potravě.

3. Resorpce a přeměny polyfenolů v trávicím traktu

Hlavním místem resorpce polyfenolů v trávicím traktu je tenké a tlusté střevo. Existují však důkazy, že některé polyfenoly přijímané v nápojích se mohou částečně resorbovat již v dutině ústní. Po vypití zeleného čaje byla koncentrace katechinů ve slinách o dva řády vyšší než v plazmě. Eliminace katechinů ze slin (poločas 10–20 min) byla mnohem rychlejší než z plazmy. Ve slinách byla také zjištěna esterase hydrolyzující epigalokatechingalát (*IV*) na epigalokatechin¹⁶.

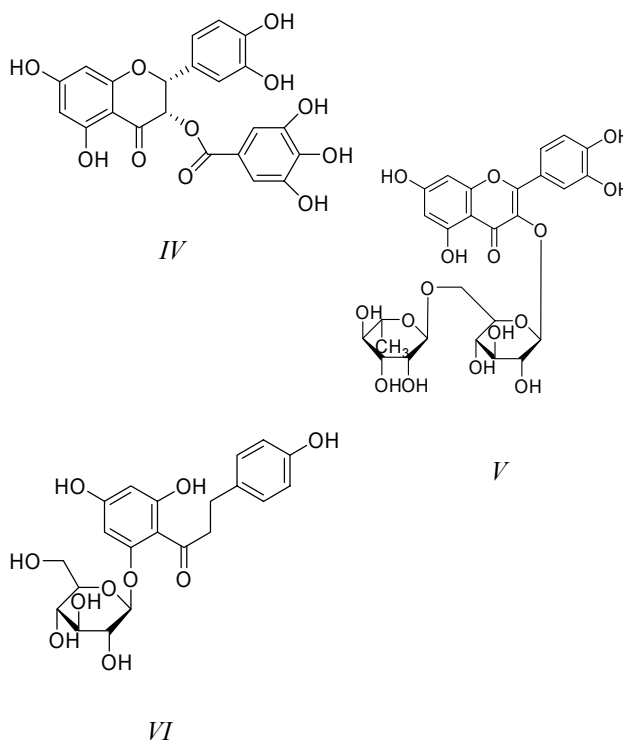
Tabulka II
Resorpce polyfenolů v tenkém střevě u osob s ileostomií

Polyfenol	Míra resorpce [%]	Lit.
Kvercetin	24 ± 9	17
Kvercetin-3-rutinosid	17 ± 15	17
Kvercetin-3-glukosid	52 ± 15	17
Chlorogenová kyselina	33 ± 17	18
Káвовá kyselina	95 ± 4	18

3.1. Procesy v tenkém střevě

Původně se předpokládalo, že polyfenoly nemohou být resorbovány z trávicího traktu člověka ve formě relativně polárních glykosidů nebo esterů. Míra jejich resorpce byla považována za nízkou a závislou na schopnosti střevní mikroflóry uvolnit nepolární aglykony, což je nutně spojeno s jejich rozsáhlou mikrobiální degradací. Tyto teoretické představy byly v souladu s experimentálními daty dokumentující nízkou a proměnnou absorpci některých polyfenolů u lidí a zvířat.

Překvapivé výsledky však přineslo studium resorpce polyfenolů v trávicím traktu u pacientů s ileostomií, tedy s chirurgickým vývodem poslední části tenkého střeva břišní



stěnou s odváděním jeho obsahu. Mikrobiální degradace sloučenin v tenkém střevě je minimální a podíl resorbovaného polyfenolu se dá vypočítat z jeho příjmu a z množství stanoveného v ileostomickém výtoku^{17,18}. Byla nalezena vysoká míra resorpce některých polyfenolů v tenkém střevě, viz tab. II. Resorpce kvercetin-3-*O*-glukosidu byla vyšší než resorpce rutinu (kvercetin-3-rutinosidu, *I*) a překvapivě vyšší než samotného aglykonu kvercetinu¹⁷. Zajímavým nálezem byla také vysoká míra absorpce fenolových kyselin, kyseliny kávové (*Ia*) a kyseliny chlorogenové (*III*), ukazující, že fenolové kyseliny mohou být snáze resorbovány z trávicího traktu než flavonoidy¹⁸. Všechny studie o biologické dostupnosti kyseliny chlorogenové publikované do roku 1999 vedly k závěru, že se tato fenolová kyselina neresorbuje z trávicího traktu člověka a živočichů¹⁹. Resorpce chlorogenové kyseliny z trávicího traktu však byla nedávno zjištěna u jedinců s ileostomií¹⁸ a je v souladu s jejím průkazem v plazmě a moči²⁰.

Přestože se některé flavonoidy pravděpodobně resorbují z trávicího traktu ve formě glykosidů, odštěpení polární složky je nebytné pro prostou difúzi většiny polyfenolů přes kartáčový lem tenkého střeva. Neenzymová deglykosidace v lidském těle, např. v kyselém prostředí žaludeční šťávy, neprobíhá. Pro přeměnu glykosidů v tenkém střevě má největší význam enzym laktasa (laktasa-florizin hydrolasa EC 3.2.1.23 a 62). Enzym je lokalizován na vnější straně membrány kartáčového lemu enterocytů, může tedy působit na polyfenoly v lumen tenkého střeva. Laktasa je především zodpovědná za hydrolyzu mléčného cukru, disacharidu laktosy. Enzym má i druhé aktivní místo schopné hydrolyzovat méně polární glykosidy, jako jsou β -glykosylceramidy a působí také na dihydrochalkonglukosid florizin (*VI*). Laktasa je poměrně nespecifická β -glukosidasa, která je schopna také štěpit flavonoidní monoglukosidy i diglukosidy, nehydrolyzuje však kvercetin-3-rhamnoglukosid (rutin, *I*). Glykosidy flavonoidů jsou překvapivě hydrolyzovány spíše laktasovou doménou laktasy-florizin hydrolasy²¹. Přes 75 % světové populace (90 % Afričanů a Asiátů, ale pouze 5 % Evropanů) má fenotyp spojený s nízkou aktivitou laktasy v dospělosti.

Laktasa není jedinou savčí glukosidasou. Cytosolová β -glukosidasa je lokalizována v různých tkáních včetně enterocytů a kolonocytů, zvláště pak v játrech. Má užší substrátovou specifitu než laktasa, na rozdíl od laktasy nehydrolyzuje např. kvercetin-3-glukosid²¹.

V krvi savců a člověka byly nalezeny některé glykosidy flavonoidů. Hydrolyza sacharidové složky není tedy pravděpodobně nutnou podmínkou účinné resorpce všech polyfenolů. V lidské plazmě a moči byly opakovaně nalezeny anthokyany, např. kyanidin-3-glukosid a kyanidin-3,5-diglukosid²². Glukosidy kvercetinu byly také detekovány v krevní plazmě dobrovolníků^{23,24}, tento náález však není plně akceptován celou odbornou komunitou. Odpůrci upozorňují na možnost záměny glukosidů za glukuronidy, protože mají při HPLC na reverzní fázi v kyselé mobilní fázi velmi blízké retenční časy a na vysokou aktivitu tkáňových β -glukosidas. Předpokládá se, že glukosidy flavonoidů mohou být transportovány do enterocytů pomocí glukosového přenašeče

závislém na Na^+ (sodium-dependent glucose cotransporter – SGLT 1). V enterocytech mohou být hydrolyzovány na aglykony a transportovány do portální krve ve formě aglykonů nebo glykosidů²⁵.

3.2. Procesy v tlustém střevě

Polyfenoly, které nejsou resorbovány v tenkém střevě, se dostávají do tlustého střeva, kde jsou metabolizovány střevními baktériemi. Z flavonoidu rutinu (kvercetin-3-rutinosid, *I*) je bakteriálními α -rhamnosidasami odštěpen aglykon kvercetin. Chlorogenová kyselina (*III*) je hydrolyzována bakteriálními esterasami na kyselinu kávovou a kyselinu chinovou. Produkty hydrolyzy, zbavené polární složky, se mohou resorbovat nebo častěji jsou dále metabolizovány střevními baktériemi. Typickými přeměnami jsou redukční nebo hydrolytické reakce. Aglykony flavonoidů jsou rozštěpeny v místě pyranového cyklu, obvyklými produkty jsou fenolové kyseliny (např. 3-hydroxyfenyloctová a 3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina, cit.^{9,26}). Fenolové kyseliny tvoří značnou část (30–60 %) metabolitů potravou přijatých flavanoidů²⁷. Fenolové kyseliny podléhají v tlustém střevě dehydroxylačním reakcím, častěji je redukován hydroxyl v *para* poloze aromatického jádra, např. z kyseliny kávové tak vzniká kyselina *meta*-kumarová (*VII*). Dále dochází k bakteriální hydrogenaci v místě dvojné vazby, kyselina kávová se přeměňuje na kyselinu 3,4-dihydroxyfenylpropionovou (*VIII*), zatímco zkrácení postranního řetězce za vzniku derivátů kyseliny benzoové probíhá pravděpodobně až po resorpci kyselin v játrech²⁶.

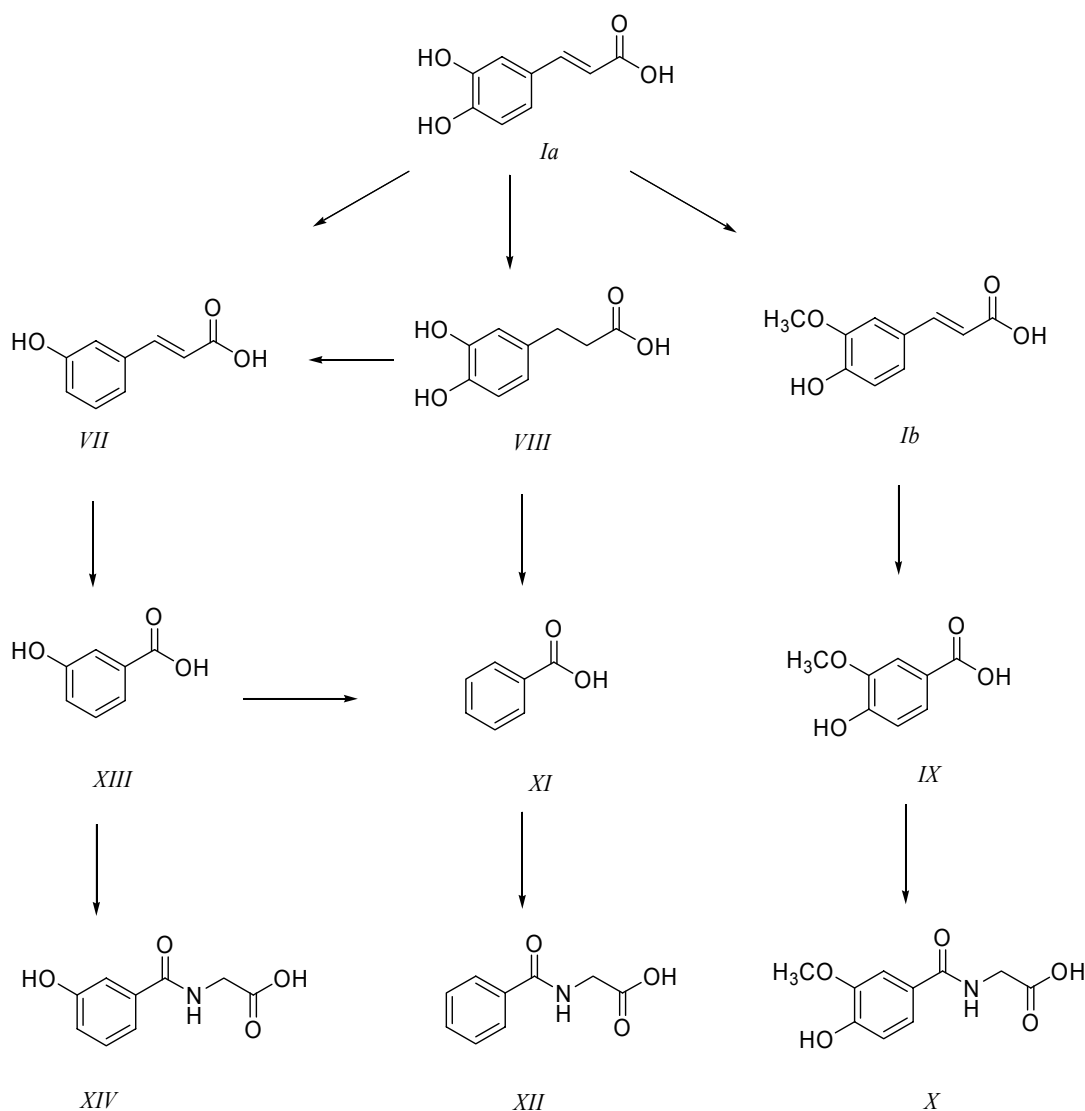
Je nutné poznamenat, že koncentrace polyfenolů v tlustém střevě vzhledem k jejich omezené resorpci v tenkém střevě a resorpci vody v tlustém střevě může dosáhnout vysokých hodnot, řádově v mmol.l^{-1} a může působit preventivně proti vzniku kolorektálního karcinomu⁹.

Polyfenoly omezují resorpci železa tvorbou stabilních komplexů s nehemovým železem v trávicím traktu²⁷. Nižší resorpce železa může mít negativní dopad na populaci náchylnou na jeho nedostatek (dětí, těhotné ženy). Na druhou stranu zvýšený příjem železa je možný rizikový faktor aterosklerózy²⁸.

4. Metabolismus polyfenolů po jejich resorpci

Po resorpci z trávicího traktu jsou polyfenoly dále metabolizovány enzymy přítomnými v tkáních člověka. Přeměny jsou velmi podobné metabolismu léčiv a jiných xenobiotik. Polyfenoly se konjugují s kyselinou glukuronovou, sírovou nebo glycinem, podléhají methyloce nebo kombinaci těchto přeměn, což vede společně s bakteriálními přeměnami v trávicím traktu k velkému počtu metabolitů.

Po resorpci jsou polyfenoly konjugovány s kyselinou glukuronovou buňkami střevní mukózy²⁹, dále mohou být v játrech nebo i v jiných tkáních konjugovány s kyselinou glukuronovou nebo sulfatovány. Methyloce katechol-*O*-methyltransferasou (COMT) probíhá v játrech nebo v ledvinách. Kyselina kávová (*Ia*) se metabolizuje COMT na



Obr. 4. Zjednodušené schéma metabolických přeměn kyseliny kávové^{26,31}

kyselinu ferulovou (*Ib*), zkrácením postranního řetězce se tvoří kyselina vanilová (*IX*), konjugací s glycinem vaniloylglycin (*X*), viz obr. 4. Methylována může být také hydroxylová skupina v *para* poloze aromatického jádra²⁶.

UDP-glukuronyltransferasy jsou lokalizovány na membránách endoplazmatického retikula a tvoří velkou skupinu enzymů. Jejich aktivita silně závisí na složení potravy, příjmu xenobiotik a genetickém polymorfismu. Fenolsulfotransferasy jsou cytosolové enzymy a jejich aktivita je v populaci velmi rozdílná a není indukovatelná xenobiotiky³⁰. Fenolové kyseliny také podléhají konjugaci s glycinem³¹ nebo jsou odbourány na hydroxyderiváty kyseliny benzoové, případně až na kyselinu benzoovou (*XI*), viz obr. 4. Kyselina benzoová poskytuje konjugaci s glycinem kyselinu hippurovou (benzoylglycin, *XII*). Značná část hippurátu vylučovaného močí je produktem odbourání fenolových

kyselin, případně flavonoidů. S glycinem se konjuguje také kyselina 3-hydroxybenzoová (*XIII*) a 4-hydroxybenzoová. Přesná struktura konjugátů polyfenolů (s kyselinou sírovou nebo glukuronovou) vznikajících v organismu většinou není známa²⁶.

Na rozdíl od většiny léčiv, které jsou často podány v jednorázové dávce větší než 100 mg, což vede k saturaci konjugčních enzymů a k významné koncentraci nekonjugovaného léčiva v krevním séru, koncentrace nekonjugovaných polyfenolů v plazmě po příjmu rostlinné potravy jsou velmi nízké. Jakmile jsou však rostlinné polyfenoly podány ve farmakologických dávkách, objeví se vysoká koncentrace nekonjugovaného polyfenolu v krvi. Dávka rovněž ovlivňuje hlavní místo biotransformace polyfenolu. Velké dávky polyfenolu jsou metabolizovány převážně v játrech, malá množství jsou přeměňována již střevní mukózou,

k sekundárním reakcím pak dochází v játrech⁹.

Předpokládá se, že konjugované polyfenoly díky své amfipatické struktuře mohou být lokalizovány na povrchu LDL-lipoproteinů a účinně tak bránit jejich oxidační modifikaci³². Byly zaznamenány velké interindividuální rozdíly v metabolismu polyfenolů pravděpodobně způsobené genetickým polymorfismem (např. rozdílná aktivita laktasy, glukuronyltransferas a COMT) a složením střevní mikroflóry.

5. Analýza a koncentrace polyfenolů a jejich metabolitů v plazmě a moči

Množství polyfenolu v krevní plazmě a moči se stanovuje většinou vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s elektrochemickou, fluorescenční nebo hmotnostní detekcí. Detekce v UV oblasti je méně vhodná s ohledem na nedostatečnou citlivost a specifitu detekce, někdy se používá pro stanovení v moči. Při některých aplikacích se stanovovaly pouze aglykony, většinou se však volí metody zahrnující stanovení konjugovaných polyfenolů. K hydrolýze konjugátů se nejčastěji používá enzymový preparát z *Helix pomatia* s β -glukuronidasovou a sulfatasovou aktivitou, méně často se používá kyselá hydrolýza.

Je-li polyfenol podán dobrovolníkům v množstvích vyskytujících se v potravě, jeho koncentrace v krevní plazmě většinou nepřekračuje $1 \mu\text{mol.l}^{-1}$, při vyšších dávkách $5 \mu\text{mol.l}^{-1}$. Rozdílný způsob metabolismu glukosidů kvercetinů a rutinů (kvercetin-3-rhamnoglukosidu) se odráží v rozdílných farmakokinetických datech. Hydrolýza glukosidů kvercetinů v tenkém střevě pomocí laktasy nebo cytosolové β -glukosidasy vede k rychlému nárůstu koncentrace kvercetinů v krvi dobrovolníků a maximální koncentrace kvercetinů je dosaženo již po 30 min od jeho příjmu. Naproti tomu z rutinů je uvolněn aglykon kvercetin až v tlustém střevě bakteriálními α -rhamnosidasami a vrcholu hladiny kvercetinů v krvi je dosaženo až po 6 h. Rovněž maximální koncentrace kvercetinů byla v případě podání kvercetin-4'-glukosidu ($3,5 \mu\text{mol.l}^{-1}$) podstatně vyšší než u rutinů ($0,2 \mu\text{mol.l}^{-1}$, cit.³³).

Polyfenoly se vylučují z organismu převážně ve formě polárních ve vodě dobře rozpustných konjugátů močí a žlučí. Předpokládá se, že může docházet k enterohepatálnímu oběhu polyfenolů, který prodlužuje vylučování polyfenolů z organismu. Poločas eliminace kvercetinů je neobvykle vysoký (18–24 h, cit.³⁴), způsobený pravděpodobně jeho silnou vazbou na plazmatické bílkoviny. U jiných polyfenolů byl zjištěn mnohem kratší poločas (1–2 h, cit.^{9,35}).

Močí se vylučuje většinou jen malá část přijatého polyfenolu. Výsledky velice závisí na typu původního polyfenolu a často se podstatně liší v různých studiích²⁷. Vysoký výdej byl zjištěn pro isoflavonoidy ze sóji (28–49 % podané sloučeniny)³⁶, flavonony citrusového ovoce (1–30 %)³⁷, katechiny z čaje (4–6 %)³⁸ a anthokyanidiny červeného vína (1–7 %)^{9,27}. Vysoké hodnoty výdeje močí byly zjištěny také u kyseliny kávové (11 %), pro její ester kyselinou chlorogenovou jsou téměř 100krát nižší³⁴. Výdej kvercetinů močí je

naopak poměrně nízký (přibl. 1 %)²⁷. Koncentrace některých metabolitů v moči (3-hydroxyhippurát (XIV), 4-hydroxyhippurát a 3-hydroxyphenylacetát) výrazně převyšuje koncentrace původních polyfenolů v moči.

6. Biologická dostupnost a antioxidační kapacita plazmy

Jak už bylo uvedeno, koncentrace původních rostlinných polyfenolů v plazmě jsou poměrně nízké a mohou jen málo přispívat ke zvýšení antioxidační kapacity plazmy, které bylo často zjištěno po příjmu potravy bohaté na rostlinné polyfenoly^{39,40}. K nárůstu antioxidační kapacity plazmy tak přispívají především metabolity. Antiradikálová aktivita některých metabolitů, které si zachovávají katecholovou strukturu nebo vznikají částečnou *O*-methylací (např. ferulová kyselina), je srovnatelná s výchozími polyfenoly⁴¹. Dlouhodobý zvýšený příjem polyfenolů vedl k vzestupu koncentrace lipofilních antioxidantů (α -tokoferol, β -karoten) v plazmě. Schopnost rostlinných polyfenolů chránit LDL lipoproteiny před oxidační modifikací je dobře dokumentována *in vitro*. Méně je zřejmé, zda skutečně dochází ke zvýšení odolnosti LDL lipoproteinů proti oxidaci po příjmu potravy bohaté na polyfenoly. Vazba polyfenolů na plazmatické bílkoviny může oslabit jejich schopnost chránit LDL před oxidací *in vivo*⁴¹.

7. Závěr

Příjem a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka patřily ještě nedávno k málo studovaným oblastem jejich výzkumu. Rostlinné polyfenoly představují významnou část antioxidantů přítomných v naší potravě a souvislost mezi jejich příjmem a zvýšením rizika onemocnění spojených s porušením antioxidační rovnováhy je v současnosti široce diskutována. Doposud nelze učinit jednoznačné závěry ohledně biologických účinků rostlinných polyfenolů v množstvích přijímaných potravou. Je však nutné zdůraznit, že některé polyfenoly ve vysokých koncentracích vykazují řadu nepříznivých účinků, např. prooxidační, mutagenní, genotoxickou a strumigenní aktivitu. Dlouhodobý efekt a bezpečnost příjmu rostlinných polyfenolů v dávkách, které převyšují jejich obsah v potravinách (např. různé potravinové doplňky), není známa⁴².

Biodostupnost a biotransformace jsou faktory, které významným způsobem limitují fyziologické účinky rostlinných polyfenolů. Výsledky získané v posledních letech ukazují, že po příjmu polyfenolů podléhají velice rozsáhlým a různorodým přeměnám jak v trávicím traktu, tak v samotném organismu. Proto je nutné věnovat více pozornosti studiu účinků jejich metabolitů. Znalost rozsahu koncentrací rostlinných polyfenolů a jejich metabolitů v krvi a tkáních je rovněž důležitá pro interpretaci výsledků experimentů získaných na buněčných kulturách, stejně jako pokusů na zvířecích modelech.

Autoři děkují Grantové agentuře ČR za finanční podporu projektu č. 303/00/D062 a 521/02/1129.

LITERATURA

1. Renaud S., De Lorgeril M.: *Lancet* 339, 1523 (1992).
2. Hollman P. C. H., Katan M. B.: *Food Chem. Toxicol.* 37, 937 (1999).
3. Le Marchand L., Murphy S. P., Hankin J. H., Wilkens L. R., Kolonel L. N.: *J. Natl. Cancer Inst.* 92, 154 (2000).
4. Giovannucci E.: *Am. J. Epidemiol.* 147, 1043 (1998).
5. Adlercreutz H.: *Lancet Oncol.* 3, 364 (2002).
6. Matějková Š., Gut I.: *Remedia* 4, 272 (2000).
7. Tůmová L.: *Česk. Farm.* 44, 18 (1995).
8. Moravcová J., Kleinová T.: *Chem. Listy* 96, 282 (2002).
9. Scalbert A., Williamson G.: *J. Nutr.* 130, 2073S (2000).
10. Slanina J.: *Chem. Listy* 94, 111 (2000).
11. Šmidrkal J., Filip V., Melzoch K., Hanzlíková I., Buckiová D., Křisa B.: *Chem. Listy* 95, 602 (2001).
12. Čepička J., Karabín M.: *Chem. Listy* 96, 90 (2002).
13. Hertog M. G. L., Hollman P. C. H., Katan M. B., Kromhout D.: *Nutr. Cancer* 20, 21 (1993).
14. Middleton E., Kandaswami C., Theoharides T. C.: *Pharmacol. Rev.* 52, 673 (2000).
15. Clifford M. N.: *J. Sci. Food Agric.* 80, 1033 (2000).
16. Yang C. S., Lee M. J., Chen L.: *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 8, 83 (1999).
17. Hollman P. C. H., de Vries J. H., van Leeuwen S. D., Mengelers M. J., Katan M. B.: *Am. J. Clin. Nutr.* 62, 1276 (1995).
18. Olthof M. R., Hollman P. C. H., Katan M. B.: *Am. J. Clin. Nutr.* 131, 66 (2001).
19. Choudhury R., Srai S. K., Debnam E., Rice-Evans C. A.: *Free Radical Biol. Med.* 27, 278 (1999).
20. Cremin P., Kasim-Karakas S., Waterhouse A. L.: *J. Agric. Food Chem.* 48, 1747 (2001).
21. Day A. J., Canada F. J., Díaz J. C., Kroon P. A., Mclauchlan R., Faulds C. B., Plumb G. F., Morgan M. R. A., Williamson G.: *FEBS Lett.* 468, 166 (2000).
22. Mülleder U., Murkovic M., Pfannhauser W.: *J. Biochem. Biophys. Methods* 53, 61 (2002).
23. Paganga G., Rice-Evans C. A.: *FEBS Letters* 401, 78 (1997).
24. Aziz A. A., Edwards C. A., Lean M. E. J., Crozier A.: *Free Radical Res.* 29, 257 (1998).
25. Walgren R. A., Lin J. T., Kinne R. K. H., Walle T.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 294, 837 (2000).
26. Rechner A. R., Kuhnle G., Bremmer P., Hubbard G. P., Moore K. P., Rice-Evans C. A.: *Free Radical Biol. Med.* 33, 220 (2002).
27. Scalbert A., Morand C., Manach C., Rémésy C.: *Biomed. Pharmacother.* 56, 276 (2002).
28. Ma J., Stampfer M. J.: *Clin. Chem.* 48, 601 (2002).
29. Spencer J. P. E., Chowrimootoo G., Choudhury R., Debnam E. S., Srai S. K., Rice-Evans C.: *FEBS Lett.* 458, 224 (1999).
30. Tapiero H., Tew K. D., Ba G. N., Mathé G.: *Biomed. Pharmacother.* 56, 200 (2002).
31. Booth A. N., Emerson O. H., Jones F. T., DeEds F.: *J. Biol. Chem.* 229, 51 (1957).
32. Terao J., Piskula M. K.: *Nutrition* 15, 790 (1999).
33. Hollman P. C., Bijman M. N., van Gameren Y., Cnossen E. P., de Vries J. H., Katan M. B.: *Free Radical Res.* 31, 569 (1999).
34. Olthof M. R., Hollman P. C. H., Vree T. B., Katan M. B.: *J. Nutr.* 130, 1200 (2000).
35. Donovan J. F., Bell J. R., Kasim-Karakas S., German J. B., Walzem R. L., Hansen R. J., Waterhouse A. L.: *J. Nutr.* 129, 1662 (1999).
36. Zhang Y., Wang G. Y., Song T. T., Murphy P. A., Hendrich S.: *J. Nutr.* 129, 957 (1999).
37. Erlund I., Meririnne E., Alfthan G., Aro A.: *J. Nutr.* 131, 235 (2001).
38. Lee M. J., Wang Z. Y., Li H., Chen L., Sun Y., Gobbo S., Balentine D. A., Yang C. S.: *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 4, 393 (1995).
39. Whitehead T. P., Robinson D., Allaway S., Syms J., Hale A.: *Clin. Chem.* 41, 32 (1995).
40. Serafini M., Maiani G., Ferro-Luzzi A.: *J. Nutr.* 128, 1003 (1998).
41. Pietta P. G.: *J. Nat. Prod.* 63, 1035 (2000).
42. Skibola C. F., Smith M. T.: *Free Radical Biol. Med.* 29, 375 (2000).
43. Adam A., Crespy V., Levrat-Verny M. A., Leenhardt F., Leuillet M., Demigné C., Rémésy C.: *J. Nutr.* 132, 1962 (2002).
44. Leontowicz H., Gorinstein S., Lojek A., Leontowicz M., Číž M., Soliva-Fortuny R., Park Y. S., Jung S. T., Trakhtenberg S., Martin-Belloso O.: *J. Nutr. Biochem.* 13, 603 (2002).

J. Slanina and E. Táborská (*Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno*): **Intake, Bioavailability, and Metabolisms of Plant Polyphenols in Humans**

The total intake of plant polyphenols in humans is ca. 1 g/day, a major part accounts for flavonoids and phenolic acids. The main polyphenol dietary sources are beverages (tea, coffee, wine, fruit juice) and fruits. There is a great uncertainty in the intake of several classes of plant polyphenols, such as oligomeric proanthocyanidins and phenolic acids. The intestinal absorption of polyphenols is probably high, but the plasma concentration of the parent polyphenol is low. A majority of polyphenols is subject to hydrolysis in digestive tract and is then metabolized by the colonic microflora largely to phenolic acids, which can be also absorbed. After absorption, polyphenols and their metabolites are further bound in tissues. These transformations lead to a number of metabolites, which mostly retain the antioxidant activity.

BÍLKOVINY HLÍZ BRAMBORU (*SOLANUM TUBEROSUM* L.) – KLASIFIKACE, CHARAKTERISTIKA, VÝZNAM

JAN BÁRTA^a a VLADISLAV ČURNÝ^b

^aKatedra rostlinné výroby, ^bBiotechnologické centrum,
Zemědělská fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích,
Studentská 13, 370 05 České Budějovice
barta@zf.jcu.cz

Došlo 17.9.03, přepracováno 12.2.04, přijato 24.2.04.

Klíčová slova: brambor hlíznatý, bílkoviny, patatin, inhibitory proteas

Obsah

1. Úvod
2. Klasifikace hlízových bílkovin
3. Patatinový komplex
 - 3.1. Základní charakteristika
 - 3.2. Genová exprese
 - 3.3. Fyziologické vlastnosti
 - 3.4. Izolace patatinu a potenciální uplatnění
4. Inhibitory proteas
5. Nutriční hodnota bramborových bílkovin
6. Závěr

1. Úvod

Hlízy bramboru hlíznatého (*Solanum tuberosum* L.) jsou obecně považovány za rostlinný produkt mající význam hlavně v lidské výživě a pro zpracovatelský průmysl. V obou uvedených případech je význam bramborové hlízy spojen s obsahem škrobu jako hlavní zásobní látkou v hlíze a v případě přímé lidské výživy též jako významný zdroj vitamínu C. Význam dusíkatých látek včetně bílkovin je pro jejich poměrně nízký obsah v čerstvé hmotě konzumentem – laikiem často opomíjen. Obvykle je uváděna střední hodnota obsahu dusíkatých látek (nebo-li hrubých bílkovin) v čerstvé hmotě hlíz cca 2 %, tzn. kolem 10 % v sušině hlíz^{1,2}. Podíl bílkovin v obsahu dusíkatých látek však může kolísat vlivem genotypu a podmínek prostředí v poměrně značném rozpětí od 34 do 70 % (cit.^{3,4}). Při 50% zastoupení v obsahu celkových dusíkatých látek jsou nebílkovinné dusíkaté látky členěny⁵ na volné aminokyseliny (15 %), amidy asparagin a glutamin (23 %) a ostatní dusíkaté látky (12 %).

2. Klasifikace hlízových bílkovin

V minulosti byla více preferována klasifikace hlízových bílkovin podle rozpustnosti – rozdělení na albuminovou, globulinovou, prolaminovou a glutelinovou frakci. Autoři se shodovali na výrazném zastoupení obou snadno rozpustných frakcí (albuminů a globulinů). Prvotně byla za hlavní frakci hlízových bílkovin považována globulinová frakce, která byla pojmenována tuberin⁶. Později byl pohled na tuberin přehodnocen, byla provedena jeho přesnější kvantifikace a uvažovalo se, že tuberin tvoří 70 % a tzv. tuberinin (albuminová frakce) 30 % obsahu hlízových bílkovin⁷. Na přelomu 50. a 60. let byla „hlízová bílkovina“ znovu klasifikována⁸ na albuminy (50 %), globuliny (26 %) a zbytek (22 %). Data z počátku 80. let pak udávají poměr 60 % pro albuminovou a 20 % pro globulinovou frakci⁹.

S rozvojem elektroforetických a chromatografických technik koncem šedesátých let začala být preferována, a v současné době převažuje, klasifikace bílkovin podle molekulové hmotnosti. Na jejím základě lze spektrum hlízových bílkovin členit na tři hlavní skupiny^{10–12}:

- patatin neboli patatinový komplex či rodina patatinových bílkovin,
- bramborové inhibitory proteas,
- ostatní bílkoviny, hlavně bílkoviny s enzymovou účastí na syntéze škrobu.

První dvě skupiny představují přes dvě třetiny obsahu bílkovin v bramborových hlízách a díky svým vlastnostem jsou předmětem poměrně rozsáhlého výzkumu, který je shrnut v následujícím přehledu.

3. Patatinový komplex

Skupinu (rodinu) patatinových bílkovin poprvé izolovali Racusen a Foote¹³ pomocí iontovýmenné a afinitní chromatografie a zřejmě se jedná o tutéž skupinu proteinů, kterou izolovali Kosier a Desborough¹⁴ frakcionací na HPLC s původním názvem tuberin. Později uvádí Desborough¹⁵ název tuberin jako nesprávný a potvrzuje identitu těchto bílkovin s patatinovými. Patatinový komplex představuje skupinu imunologicky identických glykoproteinů s původně zjištěnou molekulovou hmotností 40 000 Da (cit.^{16,17}). Dalším studiem bylo zjištěno, že patatin je pravděpodobně *in vivo* syntetizován jako „větší“ prekurzor s molekulovou hmotností 43 kDa a následně je „upravován“ odštěpením signálního peptidu, který je tvořen 23 aminokyselinami^{18,19}. V novějších publikacích je uváděna molekulová hmotnost těchto bílkovin v rozmezí 40–43 kDa (cit.^{20–23}). Patatin je zřejmě přítomný ve všech odrůdách brambor včetně příbuzných divokých diploidů ze skupiny „Andigena“ a „Phureja“^{15,16}.

3.1. Základní charakteristika

Glykoprotein patatin tvoří 20–40 % rozpustných bílkovin bramborových hlíz^{24–28}, ale byl uveden ještě vyšší podíl – až 60 % (cit.¹⁰). V nativní formě je považován za dimer s přibližnou molekulovou hmotností 80 kDa (cit.²⁹), resp. 88 kDa (cit.³⁰). Aminokyselinová sekvence monomeru čítá 366 aminokyselin³¹. Pozitivně a negativně nabitě postranní zbytky jsou náhodně rozloženy po celé sekvenci, stejně tak jsou v makromolekule přítomné jak oblasti α -helikální, tak oblasti s β -řetězcovou strukturou³². Pots a spol.³² odhaduje, že 33 % představují α -helikální oblasti a 46 % oblasti s β -řetězcovou strukturou. Navázání sacharidové části na bílkovinnou část makromolekuly je uskutečněno prostřednictvím dvou zbytků asparaginu (v pozicích 60. a 90. aminokyseliny od *N*-konce řetězce). Podíl sacharidové části představuje asi 4 % z relativní hmotnosti makromolekuly²¹.

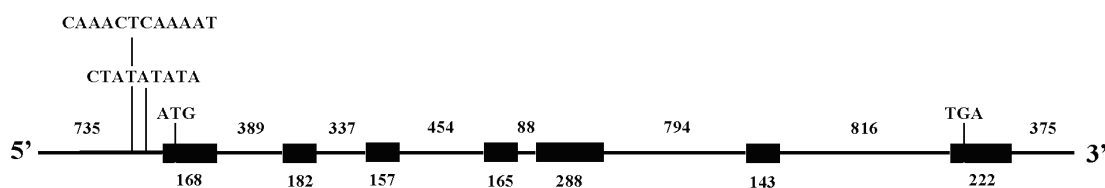
Přestože jsou jednotlivé isoformy patatinu imunologicky identické, byla mezi nimi na úrovni odrůd zjištěna rozdílná nábojová heterogenita. Při elektroforetické separaci bílkovin hlízy (SDS-PAGE) může být v „patatinové oblasti“ zjišťován rozdílný počet pruhů¹⁶. Existuje až 15 imunologicky identických glykoproteinových isoform

s podobnou hodnotou *pI* a přibližnou molekulovou hmotností monomeru 40 kDa (cit.^{30,33}). Isoformy patatinu, detailně studované u odrůdy Bintje (tabulka I), byly rozděleny do čtyř skupin A, B, C, D, přičemž isoforma A zaujímala 62 %, isoforma B 26 % a isoformy C a D zaujímaly 5 % a 7 % (cit.²²).

3.2. Genová exprese

Studiu a charakterizaci genů patatinových bílkovin bylo věnováno poměrně mnoho úsilí. Rosahl a spol.³⁴ izolovali a charakterizovali patatinový gen sekvenováním klonu cDNA a genomového fragmentu o velikosti 5,3 kb. U obou byl nalezen otevřený čtecí rámec (ORF) čítající 1158 nukleotidů. V genomové sekvenci je tento ORF přerušen šesti introny. ORF kóduje bílkovinu o velikosti 43 kDa, nicméně ta je ve finální podobě o 2,5 kDa kratší (posttranslačně upravený patatin).

Za normálních podmínek, kdy rostlina aktivně vytváří hlízy, se patatin vyskytuje ve významných množstvích jen v hlízách. V listech, stoncích a kořenech se vyskytuje pouze ve stopových množstvích (obr. 2), což je charakteristické pro zásobní bílkoviny hlíz⁴. Z hlediska genové exprese tak existují dvě třídy genů kódující patatinové bílkoviny.



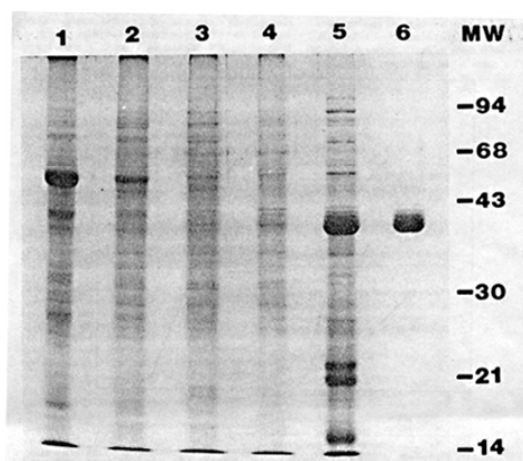
Obr. 1. Schématický diagram patatinového genu. Gen je tvořen sedmi exony (černé obdélníčky), šesti introny (spojnice mezi obdélníčky) a regulačními oblastmi, délka jednotlivých částí je uvedena v bp (převzato a upraveno z lit.³⁴)

Tabulka I

Biochemické vlastnosti rodiny patatinových bílkovin a isoform A, B a D u odrůdy Bintje²²

Analytická technika	Rodina patatinových bílkovin	Isoforma		
		A	B	D
SDS-PAGE	43 kDa	43 kDa	43 kDa	43 kDa
IEF	6 pruhů pH 4,6–5,2	2 pruhy pH 5,0; 5,2	2 pruhy pH 4,6; 4,7	1 pruh pH 4,7
PAGE (nativní elektroforéza)	2 pruhy	1 pruh (horní)	1 pruh (dolní)	1 pruh (dolní)
MALDI-TOF MS ^a	40 354 Da	40 405 Da	40 330 Da	40 473 Da
	41 590 Da	41 631 Da	41 599 Da	41 703 Da
LAH-aktivita ^b	3,72 ± 0,14	3,66 ± 0,08	3,55 ± 0,12	3,80 ± 0,14

^aMALDI-TOF MS měření bylo provedeno ve třech opakováních; ^bspecifická aktivita v $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteinu ± standardní odchylka



Obr. 2. SDS-PAGE celkové extrahovatelné bílkoviny z různých pletiv odrůdy *Superior*¹⁷. Vzorky listů (1), stonků (2) a kořenů (3) pocházely z rostlin pěstovaných na poli, které vytvářely hlízy. Vzorky stolonových špiček (4) pocházely z netuberizujících rostlin. Vzorek 5 představuje spektrum zralé hlízy a vzorek 6 purifikovaný patatin (MW je marker molekulové hmotnosti)

Multigenová rodina třídy I je exprimována výhradně v hlízách (v 50–100krát vyšších hladinách), zatímco multigenová rodina třídy II je exprimována v nízkých hladinách v celé rostlině^{35,36}. Obě uvedené třídy genů se strukturně liší přítomností (třída I) či nepřítomností (třída II) sekvenční délce 22 bází v 5' netranskribované oblasti³⁷. Počet kopií „patatinového“ genu na haploidní genom je 10 až 18 v závislosti na odrůdě³⁸.

3.3. Fyziologické vlastnosti

Patatin je v hlízách brambor považován za hlavní zásobní bílkovinu^{13,34} a je uložen ve vakuolách parenchymu²⁵. V průběhu skladování hlíz a při jejich klíčení dochází k postupnému snižování obsahu patatinových bílkovin^{10,39}, což logicky potvrzuje funkci zásobní bílkoviny. Úloha zásobní bílkoviny není patrně jediná fyziologická role patatinu. Hned od počátečních výzkumů byla u této bílkoviny objevena aktivita nesespecifické lipid acyl hydrolasy (esterázová aktivita) jak pro tvorbu voskových esterů, tak i pro deacylaci lipidů^{30,40}. Nedávno byla patatinu připsána aktivita enzymu acyl transferasa⁴¹ a také aktivita kyselého β -1,3-glukanasy⁴². Ta obecně přispívá k obraně rostlin proti houbovým patogenům hydrolýzou β -1,3-glukanů buněčných stěn hyf⁴³. Někteří autoři^{44,45} došli k závěru, že cytosolová fosfolipasa A₂ (PLA₂; EC 3.1.1.4), která katalyzuje hydrolýzu esterové vazby mastných kyselin v pozici *sn*-2 u diacylfosfolipidů, má stejné vlastnosti (molekulová hmotnost 40 kDa, pI 4,75 a vysoká homologie N-koncové sekvence polypeptidového řetězce) jako patatin a považují tak hlízový enzym s PLA aktivitou za patatin. Zajímavé je to, že fosfolipasa A₂ se účastní na signální transdukcii, vyvolávající rezistentní reakci v bramborových buňkách při inokulaci inkompatibilní rasou houbového patogena *Phytophthora infestans* nebo při kontaktu

s elicitorem komponent stěn hyf tohoto patogena⁴⁶. Předpoklad účasti patatinu na obranných reakcích ve spojitosti s produkcí fytoalexinů uvedli Andrews a spol.⁴⁷. Účast patatinu na obranných reakcích rovněž naznačuje jeho inhibiční efekt na růst larev brouků rodu *Diabrotica*, které byly jím krmené. Tento efekt byl vysvětlen cytotoxickou oxidací mastných kyselin hydrolyzovaných patatinem⁴⁸. U patatinu byla také zjištěna významná antioxidační aktivita – mezi antioxidačními látkami brambor je významem řazen na druhé místo za kyselinu askorbovou⁴⁹. Seppälä a spol.⁵⁰ prokázali alergenní schopnost patatinu (reakce s imunoglobuliny třídy IgE) prostřednictvím pozitivních „skin-prick“ testů u alergických dětí. Alergenicitu patatinu je snižována tepelnou úpravou brambor, nikoliv však jako následek jeho denaturace, ale spíše jako následek agregace s ostatními hlízovými proteiny.

Uvedený přehled fyziologických vlastností patatinu dokumentuje, že původní role zásobní bílkoviny hlíz není jediná a že hydrolytické enzymové aktivity se s největší pravděpodobností podílejí na obranném systému hlízy (rostliny) proti houbovým patogenům a hmyzím škůdcům.

3.4. Izolace patatinu a potenciální uplatnění

V současné době je výzkum patatinových bílkovin zaměřen zejména na studium vlastností souvisejících s jejich „šetrnou“ izolací (nepoškozující jejich biologickou hodnotu) z hlízové vody (potato fruit juice), která vzniká jako odpad při zpracování brambor na škrob. Doposud velkovýrobně užívané způsoby (na bázi tepelné a kyselé precipitace) jsou z hlediska zachování biologických vlastností bílkovin nevyhovující. Prostřednictvím nových studií bylo zjištěno, že strukturní integrita molekuly je zachována až do pH 6 a teploty do 28 °C (cit.^{21,32,51}). V prostředí pH 5 je terciární struktura patatinu nevratně poškozena precipitací, podobně teplotní rozmezí 55–75 °C způsobuje „rozbalování“ patatinu i ostatních bílkovin hlíz¹². Podle práce Pots a spol.⁵² má nativní patatin cylindrický tvar s průměrem 5 nm a délkou 9,8 nm. Perspektivní, s ohledem na zachování opětovné rozpustnosti precipitovaných hlízových bílkovin, je precipitace prostřednictvím nízkomolekulárních aditiv (různé kyseliny, soli kovů, organická rozpouštědla) a prostřednictvím efektu iontové síly. S ohledem na výtěžnost precipitace a stupeň opětovné rozpustnosti se jeví jako nejvhodnější precipitace ethanolem⁵³. Další možnost izolace patatinu z hlízové vody vznikající při zpracování brambor na škrob představuje využití separačních systémů na principu adsorpční chromatografie²⁵.

Pomineme-li poměrně neekonomické použití izolovaných patatinových bílkovin pro krmivářství, nabízí se možnost uplatnění těchto bílkovin v potravinářství, zejména při produkci instantních polévek, omáček, sušených výrobků z brambor (vylepšování výživné hodnoty, zvýraznění chuti atd.) nebo jako surovina pro tvorbu potravinářsky stabilních pěn¹⁵. Počítá se rovněž s využitím enzymových vlastností nativního patatinu v biotechnologických

výrobních procesech, např. pro syntézu speciálních monoacylglycerolů^{26,54}.

4. Inhibitory proteas

Kvantitativně neméně významnou skupinou bílkoviny bramborových hlíz jsou inhibitory proteas. Inhibitory proteas hrají obecně u rostlin významnou roli v obranných mechanismech proti atakujícím hmyzu a mikroorganismům inhibicí jejich specifických proteas, přičemž aktivitu vlastních proteas inhibují zřídka⁵⁵. U rostlinných druhů z čeledi *Solanaceae* bylo charakterizováno několik proteasových inhibitorů. Jde o inhibitory Bowmanova-Birkova typu s molekulovou hmotností v rozmezí 6–10 kDa vykazující specifitu vůči trypsinu a chymotrypsinu⁵⁶, inhibitory cathepsinu D (cit.⁵⁷), inhibitory Kunitzova typu s molekulovou hmotností 18–24 kDa, které primárně vykazují specifitu vůči trypsinu^{56,58,59} a cystatinové inhibitory⁶⁰. Syntéza všech těchto proteasových inhibitorů v listech rostlin je indukovatelná poraněním^{58,61}, zatímco v zásobních orgánech (hlízy brambor) se akumulují jako zásobní bílkoviny^{31,60,62}.

Inhibitory proteas představují 20–30 % extrahovatelných bílkovin hlíz brambor¹⁰. Pouvreau a spol.²⁸ našli u odrůdy Elkana asi 50 % podíl inhibitorů proteas z celkových rozpustných bílkovin hlízové šťávy. Hlízové inhibitory proteas jsou děleny do tří podtříd. Podtřída I

obsahuje bílkovinu s molekulovou hmotností 8,1 kDa, podtřída II obsahuje mimo jiné bílkovinu s $M_r = 12,3$ kDa (cit.⁶³) a třetí podtřída obsahuje inhibitory proteas o různé molekulové hmotnosti^{64,65}. Nověji byly proteasové inhibitory hlíz klasifikovány do sedmi odlišných skupin²⁸: bramborový inhibitor I (PI-1), bramborový inhibitor II (PI-2), cystein proteasový inhibitor (PCPI), aspartát proteasový inhibitor (PAPI), proteasový inhibitor brambor typu Kunitz (PKPI), karboxypeptidasový inhibitor (PCI) a ostatní serinové inhibitory.

Jedním z nejznámějších inhibitorů proteas brambor je inhibitor typu Kunitz o $M_r = 22$ kDa, který se syntetizuje jako preprotein o $M_r = 27$ kDa. Přítomnost preproteinové formy byla nejpočetnější v poraněných listech (lokální odpověď) a dále také v neporaněných listech (systemická odpověď). S využitím protilátky proti „zralé“ formě byly v hlízové bílkovině detegovány bílkoviny v rozmezí 22–24 kDa, zatímco v listech poraněných listů byly detegovány bílkoviny s vyšší molekulovou hmotností (27–28 kDa). Z uvedeného vyplývá, že genová exprese rodiny inhibitorů brambor o $M_r = 22$ kDa (typ Kunitz) je pod diferencovanou posttranslační kontrolou v závislosti na místě výskytu (listy, hlízy). Toto zjištění patrně potvrzuje rozdílné funkce uvedených bílkovin v listech (indukce po poranění, součást obranného mechanismu) a hlízách (zásobní bílkovina)⁶⁶. Navíc bylo zjištěno, že kyseliny jasmonová a arachidonová aktivují akumulaci chymotrypsinových inhibitorů v hlízách jako odezvu na stres při poranění hlízy, zatímco kyselina salicylová tento aktivační proces inhibuje⁶⁷.

Tabulka II

Obsah esenciálních aminokyselin v bílkovinách bramborových hlíz (v %)

Aminokyselina	Schuphan, Weinmann (1959)*	Joseph a spol. (1963)*	Heisler a spol. (1972)*	Kapoor a spol. (1975)*	Knorr (1980)*	Van Gel- der, Vonk (1980)*	Van Gelder (1981)*	průměr*	Standard - vaječná bíl- kovina**	AAS ^a (%)
Isoleucin	6,9	4,5	4,6	4,2	5,2	5,3	4,8	5,1	6,3	81,0
Leucin	6,7	5,8	7,9	8,0	8,5	10,3	9,8	8,1	8,8	92,0
Lysin	6,2	6,2	5,4	7,1	6,8	7,6	7,1	6,6	7,0	94,3
Methionin + cystein	2,0	3,2	— ^b	— ^b	— ^b	3,7	2,4	2,8	5,8	48,3
Fenylalanin + tyrosin	— ^b	— ^b	9,4	— ^b	10,0	12,1	11,7	10,8	10,1	106,7
Threonin	4,1	4,8	4,9	3,3	4,9	5,4	5,5	4,7	5,1	92,2
Tryptofan	1,6	1,1	n.d. ^c	1,3	n.d. ^c	n.d. ^c	1,8	1,5	1,6	93,8
Valin	5,3	5,2	4,7	4,7	6,2	6,4	6,1	5,5	6,8	80,9
Histidin	2,0	1,5	1,9	1,5	2,1	2,1	1,8	1,9	2,4	79,2

^aTabulka byla doplněna o hodnoty aminokyselinového skóre AAS (poměr obsahu esenciální aminokyseliny v hodnocené bílkovině ku obsahu esenciální bílkoviny ve referenční bílkovině, pro výpočty byly použity průměrné hodnoty a jako standard aminokyselinové spektrum celovaječné bílkoviny). Z těchto dat byl zjištěn index esenciálních aminokyselin EAAI, který dosáhl 83,7 % standardu; ^b obsah neuveden; ^c nedetegovatelné; * převzato a upraveno podle Ralet a Gueguen¹¹,

** převzato z Velišek a spol.⁵⁶

5. Nutriční hodnota bramborových bílkovin

Bílkoviny hlíz brambor patří mezi nutričně nejhodnotnější bílkoviny rostlinného původu^{5,15,68}. Nutriční hodnota bílkovin je určována zejména aminokyselinovou skladbou. Pozornost je věnována hlavně obsahu esenciálních aminokyselin v hodnocené bílkovině, jejichž případný nedostatek limituje průběh proteosyntézy u konzumenta – člověka. V tabulce II je uveden obsah esenciálních aminokyselin hlízových bílkovin z několika publikací.

Jako limitující jsou v bílkovinách hlíz uváděny sirné aminokyseliny (zejména methionin). Potenciálně je také limitující isoleucin^{11,69}. Značný význam má u bramborových bílkovin, na rostlinné bílkoviny poměrně vysoký, obsah lysinu. Pro udržování dusíkaté bilance dospělých lidí má bramborová bílkovina dokonce vyšší nutriční hodnotu než hovězí maso či maso tuňáka. Pouze vaječná bílkovina převyšuje nutriční kvalitu bramborových bílkovin⁵. Nicméně studie bílkovinné výživy malých dětí ukázala, že ve srovnání s kaseiny (hlavní bílkoviny mléka) mají bramborové bílkoviny nižší retenci dusíku⁷⁰.

6. Závěr

Bílkoviny jsou významnou složkou bramborové hlízy i přes jejich nízkou koncentraci v čerstvé hmotě. Největší podíl bílkovin hlíz představují patatin a inhibitory proteas. Obě tyto složky jsou považovány za zásobní bílkoviny hlíz, ale na rozdíl od typických zásobních bílkovin rostlin disponují významnými biologickými aktivitami, které jsou spojené s obranným systémem rostliny. Zejména patatin nabízí díky svým enzymovým (nespecifická lipid acyl hydrolasa, fosfolipasa A₂, β -1,3-glukanasa) a fyzikálně-chemickým vlastnostem uplatnění v biotechnologiích (produkce speciálních acylglycerolů, potenciální biopesticid) a v potravinářství (produkce stabilních pěn). Hlízové bílkoviny patří z nutričního hlediska mezi nejkvalitnější bílkoviny rostlinného původu a mají významný podíl na výživě obyvatel států s vysokou konzumací brambor – např. průměrný roční příjem bramborových bílkovin na hlavu je v ČR přibližně dvakrát vyšší, než bílkovin pocházejících z luštěnin. V současné době je také využíván genotypový polymorfismus hlízových bílkovin pro identifikaci odrůd brambor či při ověřování jejich pravosti v rámci obchodování s bramborami.

Autoři děkují Grantové agentuře České republiky a Ministerstvu zemědělství České republiky za finanční podporu na řešení dané problematiky (grant GA ČR č. 521/03/P036, grant NAZV QF4030).

LITERATURA

1. Debre F., Brindza J.: Rostl. Vyroba 42, 509 (1996).
2. Kolbe H., Stephan-Beckmann S.: Potato Res. 40, 135 (1997).
3. Li S. H., Sayre K. D.: Am. Potato J. 52, 341 (1975).
4. Shewry P. R.: Ann. Bot. 91, 755 (2003).
5. Markakis P., v knize: *Protein Nutritional Quality of Foods and Feeds* (M. Friedman, ed.), díl 2, str. 471. Dekker, New York 1975.
6. Osborne T. B.: *The Vegetable Proteins*. Longmans Green, London 1924.
7. Groot E. H., Janssen L. W., Kentie A., Oosterhuis H. K., Trop H. J. L.: Biochem. Biophys. Acta 1, 410 (1947).
8. Lindner K., Jaschik S., Korpaczky I.: Qual. Plant Mater. Veg. 7, 289 (1960).
9. Desborough S. L., v knize: *Isozymes in Plant Genetics and Breeding* (S. D. Tanksley and T. J. Orton, eds.), díl B, str. 167. Elsevier, Amsterdam 1983.
10. Pots A. M., Gruppen H., Diepenbeek van R., Lee van der J. J., Boekel van M. A. J. S., Wijngaards G., Voragen A. G. J.: J. Sci. Food Agric. 79, 1557 (1999).
11. Ralet M.-Ch., Gueguen J.: Sci. Aliments 19, 147 (1999).
12. Koningsveld van G. A., Gruppen H., Jongh de H. H. J., Wijngaards G., Boekel van M. A. J. S., Walstra P., Voragen A. G. J.: J. Agric. Food Chem. 49, 4889 (2001).
13. Racusen D., Foote M.: J. Food Biochem. 4, 43 (1980).
14. Kosier T., Desborough S. L.: Plant Physiol. 67, 9 (1981).
15. Desborough S. L., v knize: *Potato Physiology*, kap. 10. Academic Press, New York 1985.
16. Lee L., Hannapel D., Mignery G., Shumway J., Park W., v knize: *Plant Molecular Biology* (Goldberg R. B., ed.), str. 355. UCLA Symp., Alan R. Liss, New York 1983.
17. Paiva E., Lister R. M., Park W. D.: Plant Physiol. 71, 161 (1983).
18. Mignery G. A., Pikaard C. S., Hannapel D. J., Park W. D.: Nucleic Acids Res. 12, 7987 (1984).
19. Kirschner B., Hahn H.: Planta 168, 386 (1986).
20. Rajapakse D. P., Imai T., Ishige T.: Potato Res. 34, 285 (1991).
21. Pots A. M., Jongh de H. H. J., Gruppen H., Hessing M., Voragen A. G. J.: J. Agric. Food Chem. 46, 2546 (1998).
22. Pots A. M., Gruppen H., Hessing M., Boekel van M. A. J. S., Voragen A. G. J.: J. Agric. Food Chem. 47, 4587 (1999).
23. Pinsirodom P., Parkin K. L.: J. Agric. Food Chem. 48, 155 (2000).
24. Park W. D.: Plant Mol. Biol. Report 1, 61 (1983).
25. Straetkvern K. O., Schwarz J. G., Wiesenborn D. P., Zafirakos E., Lihme A.: Biosepar. 7, 333 (1999).
26. Macrae A. R., Visicchion J. E., Lanot A.: J. Am. Oil Chem. Soc. 75, 1489 (1998).
27. Ralet M. C., Gueguen J.: Lebensm.-Wiss. U.-Technol. 34, 266 (2001).
28. Pouvreau L., Gruppen H., Piersma S. R., Broek van den L. A. M., Koningsveld van G. A., Voragen A. G.

- J.: J. Agric. Food Chem. 49, 2864 (2001).
29. Racusen D., Weller D. L.: J. Food Biochem. 8, 103 (1984).
 30. Racusen D.: Can. J. Bot. 62, 1640 (1984).
 31. Stiekema W. J., Heidekamp F., Dirkse W. G., Beckum van J., Haan de P., Bosch ten C., Louwerse J. D.: Plant Mol. Biol. 11, 255 (1988).
 32. Pots A. M., Jongh de H. H. J., Gruppen H., Hamer R. J., Voragen A. G. J.: Eur. J. Biochem. 252, 66 (1998).
 33. Höfgen R., Willmitzer L.: Plant Sci. 66, 221 (1990).
 34. Rosahl S., Schmidt R., Schell J., Willmitzer L.: Mol. Gen. Genet. 203, 214 (1986).
 35. Pikaard C. S., Brusca J. S., Hannapel D. J., Park W. D.: Nucleic Acids Res. 15, 1979 (1987).
 36. Liu X.-Y., Rocha-Sosa M., Hummel S., Willmitzer L., Frommer W. B.: Plant Mol. Biol. 17, 1139 (1991).
 37. Mignery G. A., Pikaard C. S., Park W. D.: Gene 62, 27 (1988).
 38. Twell D., Ooms G.: Mol. Gen. Genet. 212, 325 (1988).
 39. Kumar G. N. M., Houtz R. L., Knowles N. R.: Plant Physiol. 119, 89 (1999).
 40. Racusen D.: Can. J. Bot. 64, 2104 (1986).
 41. Jimenez M., Escribano J., Perez-Gilabert M., Chazarra S., Cabanes J., Garcia Carmona F.: Lipids 36, 1169 (2001).
 42. Tonón C., Daleo G., Oliva C.: Plant Physiol. Biochem. 39, 849 (2001).
 43. Shewry P. R., Lucas J. A., v knize: *Advances in Botanical Research* (J. Callow, ed.), sv. 26, str. 135. Academic Press, London 1997.
 44. Senda K., Yoshioka H., Doke N., Kawakita K.: Plant Cell Physiol. 37, 347 (1996).
 45. Hirschberg H. J. H. B., Simons J.-W. F. A., Dekker N., Egmond M. R.: Eur. J. Biochem. 268, 5037 (2001).
 46. Senda K., Doke N., Kawakita K.: Plant Cell Physiol. 39, 1080 (1998).
 47. Andrews D. L., Beames B., Summers M. D., Park W. D.: Biochem. J. 252, 199 (1988).
 48. Strickland J. A., Orr G. L., Walsh T. A.: Plant Physiol. 109, 667 (1995).
 49. Al-Saikhan M. S., Howard L. R., Miller Jr. J. C.: J. Food Sci. 60, 341 (1985).
 50. Seppälä U., Alenius H., Turjanmaa K., Reunala T., Palosuo T., Kalkkinen N.: J. Allergy Clin. Immunol. 103, 165 (1999).
 51. Pots A. M., Gruppen H., Jongh de H. H. J., Boekel van M. A. J. S., Walstra P., Voragen A. G. J.: J. Agric. Food Chem. 47, 4593 (1999).
 52. Pots A. M., Grotenhuis ten E., Gruppen H., Voragen A. G. J., Kruif de K. G.: J. Agric. Food Chem. 47, 4600 (1999).
 53. Koningsveld van G. A., Gruppen H., Jongh de H. H. J., Boekel van M. A. J. S., Walstra P., Voragen A. G. J.: J. Sci. Food Agric. 82, 134 (2001).
 54. Anderson C., Pinsirodom P., Parkin K. L.: J. Food Biochem. 26, 63 (2001).
 55. Keil M., Sanchez-Serrano J., Schell J., Willmitzer L.: Nucleic Acids Res. 14, 5641 (1986).
 56. Velišek J. (ed.): *Chemie potravin*, 1. díl. OSSIS, Tábor 1999.
 57. Herbers K., Prat S., Willmitzer L.: Plant Mol. Biol. 26, 73 (1994).
 58. Suh S.-G., Stiekema W. J., Hannapel D. J.: Planta 184, 423 (1991).
 59. Ishikawa A., Ohta S., Matsuoka K., Hattori T., Nakamura K.: Plant Cell Physiol. 35, 303 (1994).
 60. Walsh T. A., Strickland J. A.: Plant Physiol. 103, 1227 (1993).
 61. Hansen J. D., Hannapel J. D.: Plant Physiol. 100, 164 (1992).
 62. Hannapel D. J.: Am. Potato J. 68, 179 (1991).
 63. Sanchez-Serrano J., Schmidt R., Schell J., Willmitzer L.: Mol. Gen. Genet. 203, 15 (1986).
 64. Brzin J., Popovic T., Drobic-Kosorok M., Kotnik M., Turk V.: Biol. Chem. Hoppe-Seyler 369, 233 (1988).
 65. Ritonja A., Krizaj I., Mesko P., Kopitar M., Lucovnik P., Strukelj B., Pungercar J., Buttle D. J., Barret A. J., Turk V.: FEBS Lett. 267, 13 (1990).
 66. Suh S.-G., Moon Y.-S., Hannapel D. J.: J. Plant Physiol. 154, 498 (1999).
 67. Valueva T. A., Revina T. A., Gvozdeva E. L., Gerasimova N. G., Ilinskaya L. I., Ozeretskovskaya O. L.: Appl. Biochem. Microbiol. 37, 512 (2001).
 68. Nestares T., Lopez-Jurado M., Sanz A., Lopez-Frias M.: J. Agric. Food Chem. 41, 1282 (1993).
 69. Rexen B.: Potato Res. 19, 189 (1976).
 70. Lopez de Romana G., MacLean Jr. W. C., Placko R. P., Graham G. G.: J. Nutr. 111, 1766 (1981).

J. Bárta^a and V. Čurn^b (^a*Department of Plant Production, ^bBiotechnological Centre, Faculty of Agriculture, University of South Bohemia, České Budějovice*): **Potato (*Solanum tuberosum* L.) Tuber Proteins – Classification, Characterization, Importance**

This short review is focused on potato tuber proteins - their classification, importance, and potential application in practice. A new approach to classification of tuber proteins by molecular weight is mentioned. The main and most important component of tuber proteins is patatin proteins. These are a heterogeneous group of protease inhibitors and other proteins. Patatin proteins are a family of immunologically identical glycoproteins with monomer molecular weights of ca. 40–43 kDa. Multiple enzymatic activities were found in patatin proteins, but their lipid acyl hydrolase activity is predominant. Enzymatic and other biochemical properties of patatin proteins determine their future practical application in food industry. In general, potato tuber proteins are high-quality plant proteins with an excellent nutritional and biological value.

XANTHOMOL – CHMELOVÁ PRYSKYŘICE NEBO POLYFENOL?

PAVEL HOFTA, PAVEL DOSTÁLEK a
GABRIELA BASAŘOVÁ

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6
pavel.hofta@vscht.cz

Došlo 18.8.03, přepracováno 17.10.03, přijato 27.11.03.

Klíčová slova: xanthomol, chmel, *Humulus lupulus*, pivo, prenylované flavonoidy, polyfenoly

Obsah

1. Úvod
2. Flavonoidy chmele
 - 2.1. Prenylflavonoidy chmele
3. Chemické vlastnosti xanthomolu a isoxanthomolu
 - 3.1. Biotransformace xanthomolu
4. Vliv prenylflavonoidů chmele na lidské zdraví
5. Balance xanthomolu během výroby piva
6. Závěr

1. Úvod

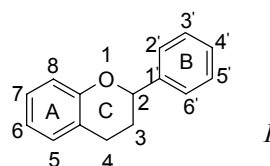
Hlávky samičích rostlin chmele (*Humulus lupulus* L.) čeledě Cannabinaceae jsou jednou ze základních surovin na výrobu piva. Obohacují pivo nejen o tolik oblíbenou hořkost, plnost chuti a vůni, ale i o řadu látek, jenž zvyšují jeho hodnotu z pohledu pivovarské technologie, moderního lékařství a farmakologie. Mezi tyto látky patří polyfenoly chalkonové řady, prenylovaný flavonoid xanthomol (XN) a jeho izomer flavanon isoxanthomol (IX). XN byl izolován již v roce 1892, pojmenován a získán ve větším množství byl až v roce 1913 a objev struktury XN a jeho izomeru byl učiněn týmem prof. Verzela již před 46 lety^{1–3}. Pozornost odborníků si však tato látka zaslouží až nyní, s rozvojem biochemických věd a výzkumu zaměřeného na lidské zdraví.

Polyfenolické látky se obecně podílejí na chemicko-fyzikální stabilitě piva, na formování pěny a na odolnosti proti stárnutí a oxidaci piva. Navíc některé z těchto látek mají silné antioxidační, antikarcinogenní, protimikrobiální, protitrombózní a další vlastnosti, které pozitivně působí na lidské zdraví. Z celkového množství polyfenolů obsažených v mladíně jich pouze 20 až 30 % pochází z chmele, ostatní pochází ze sladu⁴. Řada polyfenolických látek obsažených ve chmelu má obdobné antioxidační účinky jako syntetické antioxidyanty, které zabraňují nepříznivým projevům oxidace a jsou dnes součástí mnoha potravin. Pivo

tak může zvyšovat hladiny antioxidantů v lidském organismu, a tím zabraňovat nežádoucím oxidacím volnými radikály, které jsou příčinou řady civilizačních chorob⁵.

2. Flavonoidy chmele

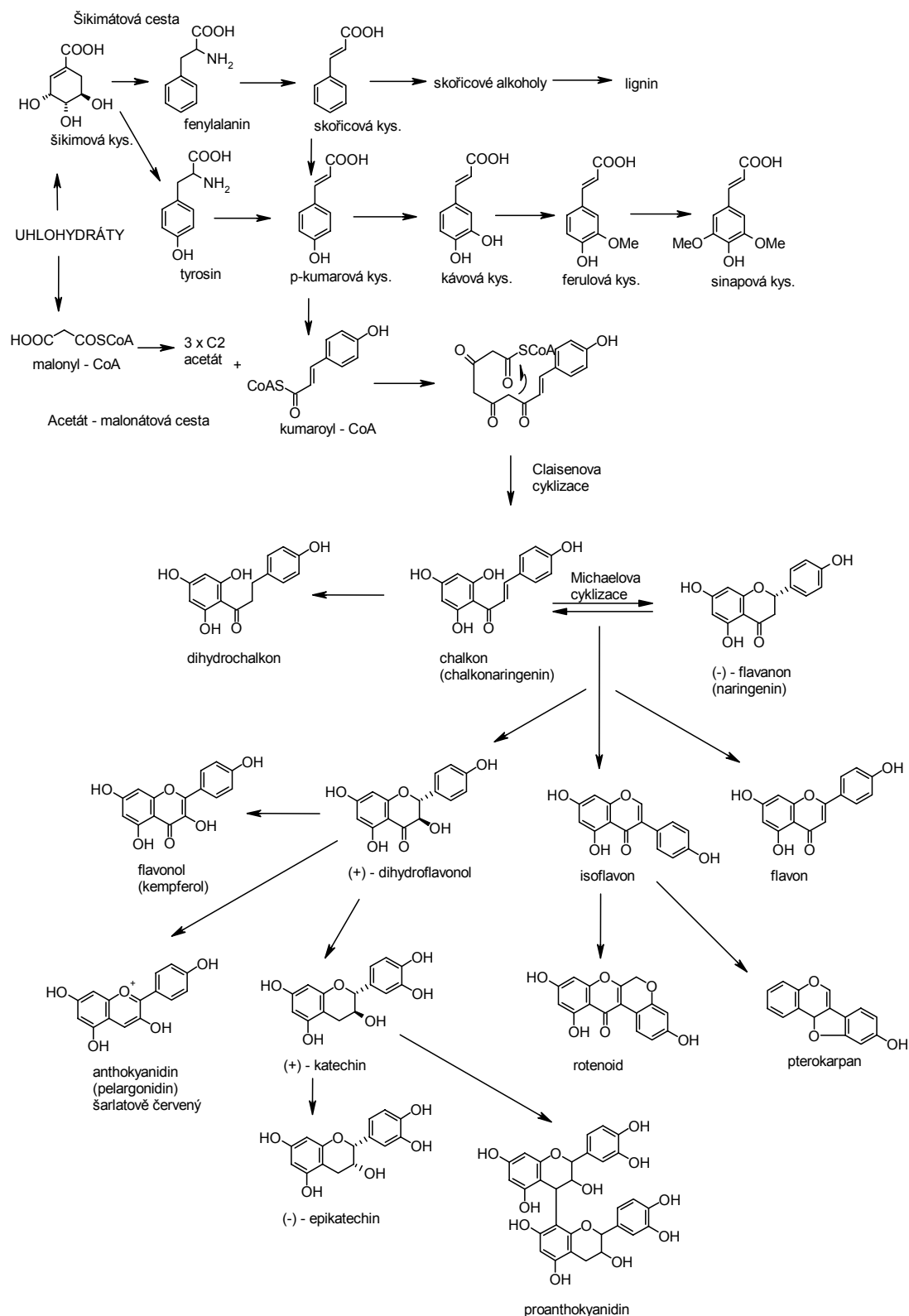
Metodou HPLC bylo ve chmelu, mladíně a pivu nalezeno a izolováno více než 100 polyfenolických látek. Nejvíce zastoupenou skupinu polyfenolových složek chmele v pivu představují flavonoidy, které patří do rozsáhlé skupiny rostlinných fenolů obsahujících v molekule dvě benzenová jádra spojená tříuhlíkatým řetězcem v uspořádání C₆–C₃–C₆, a jejichž struktura se odvozuje od skeletu heterocyklického flavanu (*I*, cit.⁶). Majoritními složkami chmele jsou nejčastěji katechin, epikatechin a jejich polymery proanthokyanidiny, dále flavonoly rutin, kvercetin a kempferol⁷. Dále také prenylovaný chalkon xanthomol⁸.

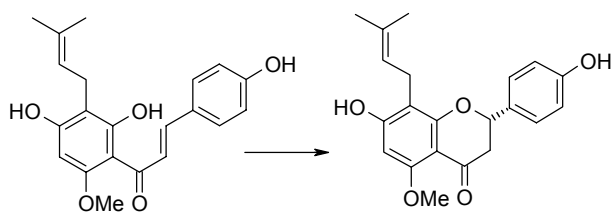


Chmelové flavonoidy se obvykle rozdělují do čtyř podskupin na chalkony, flavanoly, flavonoly a anthokyanidiny⁹. Chalkony jsou prvními intermediáty v biosyntéze flavonoidů vznikajícími reakcí mezi kyselinou kumarovou a třemi acetátovými jednotkami, katalyzovanou enzymem chalkonsynthasou. Další adice prenylu nebo geranylu mohou vést k prenylovaným chalkonům. Flavanonová struktura vzniká izomerací chalkonu enzymem chalkonisomerasou a její následná oxidace vede k flavanolům, kdežto redukce k flavanolům. Flavanolová polymerace může dále vést k dobře známým proanthokyanogenům. V tomto případě se vytváří vazba mezi C-8 kruhu A a C-4 kruhu C. Krátké polymery s méně než 10 jednotkami jsou obvykle označovány jako oligomery, kdežto dlouhé řetězce jsou známy jako taniny, viz. (schéma 1, cit.^{6,10,11}).

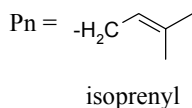
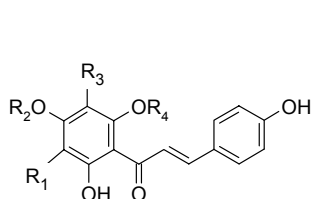
2.1. Prenylflavonoidy chmele

Pouze několik málo vyšších rostlin umí syntetizovat prenylované flavonoidy, asi 5 % známých prenylovaných flavonoidů pochází z chmele. Rostlina biosyntetizuje a sekretuje prenylflavonoidy spolu s chmelovými pryskyřicemi a silicemi do lupulinových žlázek. Chmelové hlávky obsahují poměrně velké množství flavonoidů s prenylovým nebo geranylovým substituentem na kruhu A. Více než 80 až 90 % z nich tvoří XN v množstvích 0,2 až 1,1 hm.% v sušině chmele⁸, který přechází do piva

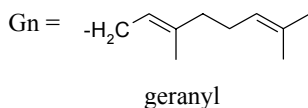
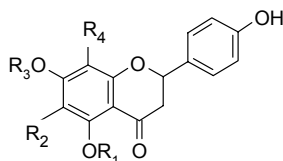
Schéma 1. Biosyntéza flavonoidů^{6,10,11}

Obr. 1. Izomerační přeměna xanthohumolu v isoxanthohumol během chmelovaru¹²

Chalkony



Flavanony

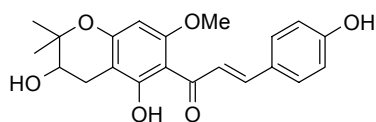


Č.	Triviální název	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
<i>Chalkony</i>					
I	Xanthohumol	Pn	H	H	Me
II	Xanthogalenol	Pn	H	Me	H
III	4'-O-Methylxanthohumol	Pn	Me	H	Me
IV	4',6'-Di-O-methylchalconaringenin	H	Me	H	Me
V	Desmethylxanthohumol	Pn	H	H	H
VI	3'-Geranylchalconaringenin	Gn	H	H	H
VII	3',5'-Diprenylchalconaringenin	Pn	H	Pn	H
VIII	5'-Prenylxanthohumol	Pn	H	Pn	Me
<i>Flavanony</i>					
XIII	Isoxanthohumol	Me	H	H	Pn
XIV	7-O-Methyl-6-prenylnaringenin	H	Pn	Me	H
XV	7-O-Methyl-8-prenylnaringenin	H	H	Me	Pn
XVI	5,7-Di-O-methyl-8-prenylnaringenin	Me	H	Me	Pn
XVII	5,7-Di-O-methylnaringenin	Me	H	Me	H
XVIII	6-Prenylnaringenin	H	Pn	H	H
XIX	8-Prenylnaringenin	H	H	H	Pn
XX	6-Geranylnaringenin	H	Gn	H	H
XXI	8-Geranylnaringenin	H	H	H	Gn
XXII	6,8-Diprenylnaringenin	H	Pn	H	Pn

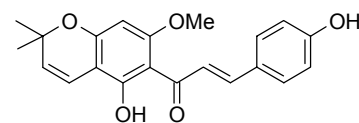
Obr. 2. Prenylované flavonoidy chmele a chmelových výrobků a jejich izomery; Pn – isoprenyl, Gn – geranyl

v izomerované formě jako IX, podobně jako např. α -hořká kyselina na iso- α -hořkou kyselinu. Tato podobnost a skutečnost, že se při analytickém stanovení používá extrakce organickými rozpouštědly, ho řadí mezi chmelové pryskyřice (obr. 1). Dále je ve chmelu více zastoupen desmethylxanthohumol (2–5 %) a xanthohumol C (1–2 %), ostatní prenylflavonoidy se ve chmelu nachází pouze ve stopovém množství^{12,13}. Chemické vzorce prenylflavonoidů chmele jsou uvedeny na obr. 2 (cit.⁸).

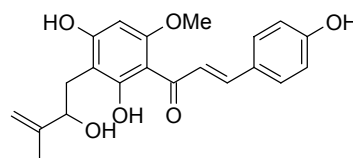
Prenylflavonoidy chmele prozkoumal zatím nejlépe Stevens a spol. Ve více než 120 vzorcích chmele (*Humulus lupulus*) a (*Humulus japonicus*) z 52 odrůd a tří divokých taxonů objevil 22 prenylovaných flavonoidů. XN byl hlavní prenylflavonoid ve všech vzorcích chmele a byl doprovázen 11 strukturálně podobnými chalkony. Deset flavonoidů bylo identifikováno jako flavanonové izomery těchto chalkonů. Tři jiné prenylované chalkony byly objeveny v americké odrůdě Galena, jeden z nich, který byl identifikován jako 3'-prenyl-4'-O-methylchalconaringenin,



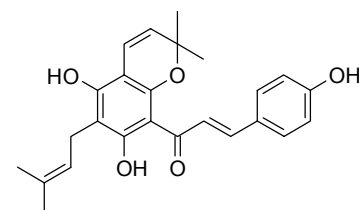
IX Xanthohumol B



X Xanthohumol C



XI Xanthohumol D



XII Xanthohumol E

byl pojmenován xanthogalenol. K identifikaci byla používána HPLC s hmotnostní detekcí fragmentů (MS-CID a CAD), která však neuměla rozdělit chalkony od jejich izomerovaných flavanonů, proto byla používána i UV detekce. Většina chalkonů má absorpční maxima blízko 370 nm, kdežto jejich izomerované flavanony blízko 290 nm. Z českých odrůd byly zkoumány bezvirovní klony č. 36, 38 a 72 Žateckého poloraného červeňáku (Saazer). Bylo zjištěno, že ze zkoumaných odrůd obsahují nejvíce desmethylxanthohumolu, zato však neobsahují žádný xanthogalenol ani jiné 4'-*O*-methylchalkony, a tudíž ani žádné jejich izomerované flavanony⁸.

Obsah XN a ostatních prenylflavonoidů ve chmelu závisí na odrůdě a stresových faktorech, dále pak na skladování podobně jako u α -hořkých kyselin. Během půlročního skladování může obsah prenylflavonoidů poklesnout až o 50 % (cit.¹⁴). U odrůd Nugget a Perle pěstovaných v USA a Německu bylo zjištěno, že množství XN ve chmelu závisí nejen na odrůdě, ale i na pěstební oblasti a pěstebních podmínkách^{15,16}. Aromatické odrůdy ho obsahují méně než odrůdy vysokoobsažné. Žatecký poloraný červeňák ho obsahuje podle Fostera asi 0,35 hm.% v sušině¹⁶. České odrůdy ze sklizně 2002 obsahovaly podle Chmelařského institutu průměrně: Žatecký poloraný červeňák 0,33 hm.% XN v sušině, Premiant 0,37 hm.% XN v sušině, Sládek 0,71 hm.% XN v sušině, Bor 0,49 hm.% XN v sušině, Agnus 1,01 hm.% XN v sušině. Obsahy XN u zahraničních odrůd se pohybovaly v rozmezí 0,22–1,09 hm.% v sušině¹⁷.

3. Chemické vlastnosti xanthohumolu a isoxanthohumolu

XN je žluto-oranžová krystalická látka nepolární povahy obsažená spolu s chmelovými pryskyřicemi a silicemi v chmelových hlávkách všech chmelových odrůd. Je to látka, která patří mezi chalkony a prenylované flavonoidy. Její povahou je možné ji řadit mezi polyfenoly i mezi chmelové pryskyřice. Bod tání této látky je 160 °C. Podle Stevense je XN téměř nerozpustný ve vodě (1,3 mg.l⁻¹ při 8 °C, cit.¹²), petroletheru a pivu (4 mg.l⁻¹ při 8 °C, cit.¹²), krystalizuje v 50% ethanolu, 50% acetonu, kyselině octové, chloroformu, benzenu a toluenu. S ethanolovým roztokem chloridu železitého tvoří hnědo-černé sloučeniny. Není opticky aktivní. Rozpouští se v silném hydroxidu a v kyselině sírové za tvorby tmavě červené sloučeniny. Chalkon XN se ve slabě alkalickém prostředí (5% NaOH) izomeruje z 95 % na flavanon IX, zpětná konverze na XN s výtěžkem okolo 5 % je možná pomocí 40% kyseliny fluorovodíkové³. Molekulový vzorec XN je C₂₁H₂₂O₅ a jeho molekulová hmotnost je 354,4 g.mol⁻¹. Číslo v databázi CAS je [6754-58-1]. Maximální absorbance XN v UV záření je při 367,8 nm (1 mg XN/ 100 ml methanolu)¹⁸. Chemické vlastnosti ostatních prenylflavonoidů chmele jsou uvedeny v tabulce I, cit.⁸.

IX je světle žlutá krystalická látka, méně rozpustná než XN. S ethanolovým roztokem chloridu železitého tvoří

Tabulka I
Chromatografická a spektrální data prenylflavonoidů⁸

Č.	Triviální název	UV $\lambda_{\max}$ [nm] v MeOH	APCI- MS, m/z (MH) ⁺
<i>Chalkony</i>			
1	Xanthohumol	368	355
2	Xanthogalenol	365	355
3	4'- <i>O</i> -Methylxanthohumol	367	369
4	4',6'-Di- <i>O</i> - methylchalkonaringenin	367	301
5	Desmethylxanthohumol	366	341
6	3'-Geranylchalkonaringenin	367	409
7	3',5'-Diprenylchalkonaringenin	372	409
8	5'-Prenylxanthohumol	371	423
9	Xanthohumol B	370	371
10	Xanthohumol C	371	353
11	Xanthohumol D	369	371
12	Xanthohumol E	369	407
<i>Flavanony</i>			
13	Isoxanthohumol	287	355
14	7- <i>O</i> -Methyl-6-prenylaringenin	291	355
15	7- <i>O</i> -Methyl-8-prenylaringenin	291	355
16	5,7-Di- <i>O</i> -methyl-8- prenylaringenin	287	369
17	5,7-Di- <i>O</i> -methylaringenin	283	301
18	6-Prenylaringenin	291	341
19	8-Prenylaringenin	291	341
20	6,8-Diprenylaringenin	295	409
21	6-Geranylaringenin	294	409
22	8-Geranylaringenin	294	409

tmavě žluté sloučeniny³. Maximální absorbance IX v UV záření je při 287 nm (1 mg IX/ 100 ml methanolu)¹⁸.

Typické polyfenoly jsou koncentrovány v listenech chmelových šištic a mají polární charakter, a proto jsou dobře rozpustné v horké vodě. V nepolárních rozpouštědlech jako je např. CO₂ nebo hexan jsou velmi málo rozpustné. Ačkoli většina flavonoidů je dobře rozpustná v horké vodě, nepolární XN tvoří výjimku. Hromadí se spolu s tvrdými pryskyřicemi a oleji v lupulinových žláz-

kách, ale ne v listenech chmelových šištic. V superkritickém CO₂ (např. při 30 MPa, 50 °C) je XN rozpustný pouze ve stopách. V ethanolu se rozpouští 90 % všech prenylflavonoidů chmele, XN je proto zastoupen v ethanolových extraktech chmele a jeho koncentrace zde může dosáhnout až k 10 hm.% (cit.¹⁵).

3.1. Biotransformace xanthohumolu

Ačkoliv se flavonoidy hojně vyskytují v přírodě, o jejich metabolismu v živočišných organismech toho víme málo. Primárně se flavonoidy biotransformují játry a střevní mikroflórou. Pomocí glukuronidace (na volnou OH skupinu flavonoidu se naváže kyselina glukuronová) se vylučují např. kvercetin, rutin, genistein a kempferol, avšak o biotransformacích prenylovaných flavonoidů víme jen málo. Glukuronidace je hlavní metabolická cesta 2. fáze detoxifikačních procesů většiny xenobiotik, včetně flavonoidů a je katalyzována enzymem UDP-glukuronosyl transferasou, která je součástí membrány endoplazmatického retikula buněk jaterních mikrosomů. Výzkum se zaměřil na glukuronidy XN z potkaních a lidských jater. Metodou HPLC byly nalezeny dva hlavní glukuronidy XN. V glukuronidu G1 se navázala kyselina glukuronová na XN přes hydroxylovou skupinu jádra A a v glukuronidu G2 se navázala kyselina glukuronová na XN přes hydroxylovou skupinu jádra B (cit.¹⁹). V další studii se výzkum zaměřil na metabolismus XN potkaními jaterními mikrosomy a odhalil, že je XN odbouráván na 3 polární metabolity. Dva byly identifikovány jako hydroxylované isopropylidihydrofurano deriváty XN a třetí jako 2- nebo 3-hydroxyxanthohumol (cit.²⁰). Odbourávání XN kvasinkou *Pichia membranifaciens* vedlo ke třem metabolitům, vznikl *(E)*-2''-(2'''-hydroxyisopropyl)-dihydrofurano[2'',3'':4',3'']-2',4'-dihydroxy-6'-methoxychalkon, dále pak *(2S)*-2''-(2'''-hydroxyisopropyl)-dihydrofurano[2'',3'':7,8]-4'-hydroxy-5-methoxyflavanon a *(E)*-2''-(2'''-hydroxyisopropyl)-dihydrofurano[2'',3'':2',3'']-4'-hydroxy-6'-methoxychalkon. Odbourávání probíhá tak, že nejprve vzniká z prenylové skupiny epoxid mezi 2. a 3. uhlíkem prenylu, posléze probíhá nukleofilní cyklizace za vzniku dvou chalkonů jako produktů²¹.

4. Vliv prenylflavonoidů na lidské zdraví

Preparát obsahující jako účinné látky XN a humulon byl v USA patentován jako léčebný prostředek na osteoporózu^{22,23}. Dále u něj byla prokázána vysoká antioxidační aktivita při inhibici mědi katalyzované oxidace LDL (nizkodenzitní lipoprotein), která hraje roli při vzniku aterosklerózy a může vést k cévním chorobám, infarktu myokardu, arterioskleróze či mrtvici^{24–26}. XN a xanthohumol B inhibují enzym diacylglycerolacyltransferasu (DGAT) [EC 2.3.1.20], která přeměňuje diacylglycerol na triacylglycerol, a tím chrání opět proti ateroskleróze. Vyšší hladiny triacylglycerolů v určitých orgánech a tkáních těla zvyšují

riziko obezity, ztučnění jater (steatózy) a hypertriglyceridemie vedoucí k vážným chorobám jako např. ateroskleróze, cukrovce, metabolickému zvratu a snížení funkčnosti některého orgánu²⁷. Tyto a jiné vlastnosti řadí XN, IX a ostatní prenylflavonoidy chmele spíše mezi polyfenoly, neboť antioxidační kapacita je přímo spjata s počtem hydroxylových skupin.

IX, který se nachází v pivu, má prokázané antikarcinogenní účinky. Při blokování škodlivě působících enzymů je dokonce účinnější než XN (cit.²⁸).

XN a některé chmelové prenylflavonoidy mohou inhibovat enzymy cytochromu P-450, které přeměňují prokarcinogeny v karcinogenní sloučeniny. Poznatky naznačují, že tyto chmelové prenylflavonoidy mohou být efektivními protinádorovými léčivy, které blokují cytochromem P-450 zprostředkovanou aktivaci prokarcinogenů a indukují karcinogen-detoxifikační enzym chinonreduktasu²⁹. Studie ukazují, že XN, xanthohumol C a IX mají efektivní protinádorové účinky na buňky lidského karcinomu prsu (MCF-7), tlustého střeva (HT-29) a vaječníků (A-2780) v dávkách od 0,1 do 100 μM (cit.³⁰).

Chmel je vedle sóji a jetele jedním z nejbohatších přírodních zdrojů fytoestrogenů. Zvláště zajímavé jsou fytoestrogenní vlastnosti prenylflavonoidů. Estrogenní aktivita prenylovaných flavonoidů je dobře známa, dříve se myslelo, že ji způsobuje XN, někdy také pro tuto vlastnost nazývaný chmelový hormon, avšak z novějších poznatků vyplývá, že samotný XN nemá žádnou estrogení aktivitu. Estrogenní vlastnosti byly však prokázány u IX a 8-prenylnaringenin u a několika dalších prenylovaných flavanonů. 8-Prenylnaringenin patří mezi nejsilnější rostlinné estrogény neboli fytoestrogény vůbec. Ve chmelu jsou tyto látky obsaženy pouze v nepatrném množství, v hotovém pivu se tak nalézají ve stopovém množství a jejich obsah se pohybuje od 0,4 do 4,0 mg.l⁻¹ (cit.^{31–33}).

V dnešní době se můžeme setkat i na našem trhu s řadou přírodních preparátů obsahujících flavonoidy sóji, isoflavony, které údajně snižují riziko výskytu různých typů rakoviny a mají i příznivý vliv proti kornatění srdečních tepen. Pomáhají údajně i při klimakterických potížích, při poruchách menstruace, při depresích, zvýšené únavě, bolestech hlavy, migrénách, závratích, nespavosti apod. Podobné účinky se předpokládají i u některých chmelových flavonoidů, zvláště u těch s fytoestrogenní aktivitou.

5. Bilance xanthohumolu během výroby piva

Prenylflavonoidy chmele se dostávají do piva během chmelovaru nebo druhotného chmelení. Stevens a spol. provedli několik pokusných chmelení. Jestliže se chmelilo jednou dávkou na začátku chmelovaru (172 g na 12° pivo) byla účinnost extrakce XN horkou vodou asi 87 rel.% Z množství XN, který přešel do mladiny chmelovarem, bylo asi 18 rel.% navázáno na zkoagulované bílkoviny a asi 12 rel.% se ztratilo v horkých kalech. V odpadním chmelu zůstalo asi 13 rel.% Další ztráty vznikaly během chlazení kalů (6 %) a fermentace (11 %). Pouze asi

30 rel.% se nalézalo v hotovém pivu, 98 % bylo však ve formě IX. Celková ztráta XN byla kolem 60 rel.% + 13 rel.% ztráty extrakcí. Stabilizace piva polyvinylpolypyrrolidonem (PVPP) snížila obsah IX asi o 30 rel.% Jestliže se chmelilo na dvě dávky, na začátku chmelovaru 128 g a na konci 137 g, celkem tedy 265 g na 12° pivo, pak bylo ztraceno v odpadním chmelu a horkých kalech asi 40 rel.% Pouze asi 22 rel.% se nalézalo v hotovém pivu. Celková ztráta byla asi 64 rel.% + 14 rel.% ztráty extrakcí. Konečný obsah IX v lahvových pivech světových značek se proto pohybuje od 0,4 do 4,0 mg.l⁻¹, obvykle okolo 1,5 mg.l⁻¹ (cit.^{12,16}).

Forster zkoumal, jaké množství přidaného XN zůstane v hotovém pivu. Z počáteční dávky 5 mg XN do 1 litru sladinu zbylo na konci 35 min dlouhého chmelovaru v mladině 0,4 mg XN a 1,5 mg IX, celkem byla suma látek 1,9 mg, což je 38 rel.% Na konci kvašení byla suma obou látek už jen 30 rel.% A po konečné filtraci a stabilizaci jen 15 rel.% (cit.³⁴).

6. Závěr

XN, IX a ostatní prenylflavonoidy chmele jsou pozoruhodné sloučeniny, které teprve nyní nacházejí využití jak v pivovarském průmyslu, tak i v řadě jiných odvětví. XN může sloužit jako přírodní antioxidant a jako látka prospěšná lidskému zdraví nejen v pivu, ale i v nových typech léčiv a potravinových doplňcích. Je to látka, která zvyšuje trvanlivost piva i jeho užitnou hodnotu. Vzrůstající počet zpráv o využití těchto látek k léčbě řady nádorů a civilizačních nemocí nabízí využití v chemoprevenci těchto chorob. Už nyní se XN používá k léčbě osteoporózy a v budoucnu se jeho aplikace jistě rozšíří. V Německu se vážně zabývají využitím zbytku po extrakci CO₂, který obsahuje velké množství prenylflavonoidů, a přidávají ho do piva za účelem zlepšení trvanlivosti, hořkosti a užitné hodnoty piva³⁵. Potenciál prenylovaných flavonoidů je obrovský, v blízké budoucnosti si tyto látky mohou najít uplatnění i v oborech, kde bychom je vůbec nečekali.

LITERATURA

- Seyfferth: Ztschr. f. d. ges. Brauwesen 6, 31 (1892).
- Power F., Tutin F., Rogerson H.: J. Chem. Soc., 1267 (1913).
- Verzele M., Stockx J., Fontijn F., Anteunis M.: Bull. Soc. Chim. Belg. 66, 452 (1957).
- De Keukelaire D.: Pharm. Pharmacol. Lett. 7, 83 (1997).
- Piendl A., Biendl M.: Brauwelt Int. 4, 310 (2000).
- Čepička J., Karabín M.: Chem. Listy 96, 90 (2002).
- Hofta P.: *Diplomová práce*. VŠCHT Praha, Praha 2002.
- Stevens J. F.: Phytochem. 53, 759 (2000).
- Rice-Evans C.: Free Radical Biol. Med. 20, 933 (1996).
- Rice-Evans C. A., Miller N.J., Paganga G.: Trends Plant Sci. 2, 152 (1997).
- Stevens J. F.: J. Am. Soc. Brew. Chem. 56, 136 (1998).
- Stevens J. F.: J. Agric. Food Chem. 47, 2421 (1999).
- Biendl M.: Cerveza Malta 38, 25 (2001).
- Hansel R., Schulz J.: Deutsche Apoth. Ztg. 126, 2033 (1986).
- Forster A., Beck B.: Monatsschr. Brauwiss., 5/6, 98 (2002).
- Forster A., Gahr A.: Monatsschr. Brauwiss. 9/10, 184 (2002).
- Krofta K.: Kvas. Prum. 49, 62 (2003).
- Rausch H.: Xanthohumol Certificate of Analysis, Phytochem, Ichenhausen 2001.
- Yilmazer M., Stevens J. F., Buhler D. R.: FEBS Lett. 491, 252 (2001).
- Yilmazer M.: Drug Met. And Disp. 29, 223 (2001).
- Stettner G., Methner F.-J., Biendl M.: 29th International Congress of the European Brewery Convention, Dublin, 17. - 22.5. 2003, Poster č. 4. Dublin 2003.
- Tobe H.: Biosci. Biotech. Biochem. 59, 740 (1997).
- US Patent and Trademark Office, US 5 679 716, (1997).
- Miranda C. L.: J. Agric. Food Chem. 48, 3876 (2000).
- Mosinger B.: Cor Vasa 36, 171 (1994).
- Biendl M.: Brauwelt I, 39 (2002).
- Tabata N.: Phytochem. 46, 683 (1997).
- Vinson J. A.: J. Agric. Food Chem. 47, 2502 (1999).
- Henderson M.: Xenobiotica 30, 235 (2000).
- Miranda C. L.: Food Chem. Toxicol. 37, 271 (1999).
- De Keukelaire D.: EBC Proceedings of the 26th Congress, 29, str. 239, Maastricht 1997.
- De Keukelaire D.: EBC Proceedings of the 28th Congress, 7, str. 82, Budapest 2001.
- Stevens J. F., Taylor A. W., Deinzer M. L.: J. Chromatogr., A 832, 97 (1999).
- Forster A., Beck B., Schmidt R.: Hopfenrdsch. Int. 69 (1999).
- Herath W. H. M. W.: Phytochem. 62, 673 (2003).

P. Hofta, P. Dostálek, and G. Basařová
(Department of Fermentation Chemistry and Bioengineering, Institute of Chemical Technology, Prague): **Xanthohumol - a Hop Resin or Hop Polyphenol ?**

The existing and new findings on xanthohumol and other prenylated hop flavonoids are reviewed. First, synthesis of flavonoids and prenylated flavonoids in plants is described. The contents of major prenylflavonoids in hops in general and the xanthohumol contents in Czech cultivars in the last year are listed. Formulae of all the known hop prenylflavonoids and their chemical, physical and biochemical properties are given. Their effect on human health and their current and potential future utilization are discussed. Biotransformations of xanthohumol in microorganisms, mammals and humans are also mentioned. The balance of xanthohumol and isoxanthohumol in the production of beer is given.

Chytrý glukán

Jako β -glukany jsou označovány polymery glukosy, ve kterých je glukosa vázána vazbami nejčastěji v poloze 1,3 nebo 1,6, a v přírodě se vyskytují v nejrůznějších organismech a formách. Zájem o tyto polysacharidy je dán jejich pozitivním účinkem na obranyschopnost organismu. Historie užívání polysacharidů coby imunomodulátorů je dlouhá, první pokusy využívaly tzv. Shearův polysacharid již před více než 60 lety. Zájem potom na čas opadl a objevil se znovu až v šedesátých letech v souvislosti s průkazem účinku zymosanu (což je hrubý extrakt buněčných stěn kvasinek) na aktivaci komplementového systému. Od osmdesátých let pak prudce vzrostl zájem vědců z celého světa o β -glukán, zejména díky tomu, že glukany začaly být dostupné (jak laboratorně tak i komerčně) v rozpustné podobě.

Primární zdroje β -glukanů pro imunomodulační studie jsou kvasinky (zejména v Evropě a USA), nejrůznější houby (zejména Japonsko, Čína a Rusko), obiloviny (Kanada) a mořské řasy (Francie). Důvody jsou víceméně tradiční, částečně dané větší dostupností jednotlivých zdrojů. Jednotlivé β -glukany se významně liší v konfiguraci, větvení, molekulové hmotnosti, rozpustnosti a trojrozměrné struktuře a všechny tyto rozdíly se výrazně odrážejí v jejich biologických vlastnostech.

Studie biologických vlastností β -glukanů se nejdříve zaměřily na infekční imunitu a později na oblast léčení rakoviny. Po úspěšných výsledcích byly v polovině osmdesátých let v Japonsku povoleny dva typy β -glukanů, Lentinan (pochází z houby *Lentinus edodes*) a Schizophyllan (z *Schizophyllum commune*), coby podpůrná léčba při léčbě některých typů zhoubných nádorů.

O imunoaktivním působení β -glukanů existuje v současné literatuře více než 1500 často velmi kvalitních publikací. Stimulační účinky nejrůznějších β -glukanů byly popsány již u evolučně primitivních Arthropoda, kde se jedná o aktivaci srážecích kaskád. Prostřednictvím proteolytického štěpení serinovými proteinasami vzniká gelovitá sraženina, která zabraňuje dalšímu pohybu invadujících mikroorganismů. Principiálně odlišný, nicméně podobně účinný efekt β -glukanu byl prokázán i u koryšů, kde protein, který váže glukán, aktivuje fenoloxidasu. Další studie prokázaly stimulaci imunitních reakcí u žíhal, ryb, kuřat, myší, krys, králíků, morčat, prasat, ovcí, koní a krav, takže je β -glukán považován za jednu z mála látek, které jsou účinné v celém spektru živočišných druhů. β -Glukán je pravděpodobně také evolučně velice starý imunostimulans a některé práce dokazují i aktivaci obranných mechanismů rostlin.

Poslední desetiletí také pomohlo odhalit otázku, jak vlastně β -glukany fungují. Na membráně buněk savců sice existuje několik receptorů, se kterými β -glukany interagují, ale pravděpodobně nejdůležitější je receptor pro třetí složku komplementu (CR3, CD18/CD11b). Po vazbě β -glukanu na tento receptor dochází k jeho aktivaci, která vede k degranulaci buněk, a tím uvolnění bakteriolytických a bakteriostatických molekul. K tomu však dochází pouze v případech, že se na část tohoto receptoru naváže C3, přítomná například na bakteriích nebo nádorových buňkách. Přítomnost β -glukanu je přitom nezbytná, neboť jeho vazba je pro aktivaci buněk nutná.

Otázkou proto zůstává, jak je možné, že β -glukán již dávno nepatří mezi oblíbené léky. Důvodů je hned několik. Počet individuálních glukánů je prakticky stejně velký jako je počet zdrojů použitých k jejich izolaci. I při snaze zajistit stejné výrobní podmínky není prakticky možné zaručit u odlišných izolátů stejné vlastnosti. To je v příkrém rozporu s regulačními předpisy moderního farmaceutického průmyslu. Dále potom snahy o porovnání biochemických a fyzikálně-chemických vlastností se schopnostmi ovlivňovat obranné reakce organismu většinou dospěly k rozporným výsledkům. Většinou se uvádí, že biologicky neúčinnější jsou β -1,3-glukany o molekulové hmotnosti v rozpětí 5 až 10 000 kD a s relativně nečetným větvením v poloze 1,6. Dlouho se předpokládalo, že biologická aktivita závisí také na zdroji. Například obilné glukany byly často neúčinné a teprve v poslední době se zdá, že se jednalo spíše o nedokonale přečištěné glukany. Poslední studie využívající až 99% preparáty nalezly aktivitu plně srovnatelnou s glukany pocházejícími z kvasinek. K problémům použití β -glukanů přispěly také často neseriózní reklamní kampaně, povětšinou na internetové úrovni, které vydávají β -glukany za něco na úrovni všeléku léčícího všechno od úbytku vlasů přes rakovinu až po impotenci. Navíc často není v preparátu prakticky žádný glukán, o tom, že by firma své produkty nějak testovala, ani nemluvě. Není proto divu, že se farmaceutické firmy do nákupu licencí příliš nehrnou.

Je to škoda, β -glukanů se totiž pomalu, dalo by se říci plíživě, chopily čiperné firmy využívající nezáměrně farmaceutických gigantů, a nabídly β -glukany pro účely zvýšení obranyschopnosti komerčně chovaných zvířat. Bez většího zájmu veřejnosti jsou dnes β -glukany obsaženy v krmivu pro více než 80 % všech komerčně chovaných lososů a několik norských firem vyrábí a úspěšně prodává svůj β -glukán po tunách.

Poslední dva roky se dočkaly i průkazů stimulace imunitních mechanismů pomocí synteticky připravených oligosacharidů se strukturou podobnou či odvozenou od β -glukanů. To by mohlo být pro farmaceutické firmy zajímavější, nežli pracně bojovat s izolacemi glukanu z přírodních materiálů, navíc každá z nich má zcela jistě patentovány stovky a tisíce sacharidů, o jejichž biologických vlastnostech nemají ani potuchy. Syntéza glukánů ale naráží na značné obtíže a zatím je ekonomicky nevýhodná, zvláště u delších sacharidových řetězců.

Malé firmy si stále proměřují obsah glukanu v preparátu testem s kyselinou sírovou a počet laboratorní schopných a ochotných za poplatek otestovat, jaký to sacharid vlastně v prášku nebo roztoku je, můžeme spočítat na jedné ruce. Když si k tomu připočítáme, že jen ve Spojených státech existuje minimálně 300 firem prodávajících nějaký glukán a v mnohem menších Čechách vím sám nejméně o čtyřech, možnost hospodářských smluv by tu jistě byla i pro nějakou českou laboratoř.

β -Glukany se pravděpodobně nikdy nestanou nějakou záračnou pilulkou, která zbaví lidstvo všech chorob, na druhé straně je ale možné, že díky šarlatánství několika odmitáme produkt, který může pomoci mnoha.

Václav Větička

MANNICHOVA A PŘÍBUZNÉ REAKCE V TOTÁLNÍ SYNTÉZE ALKALOIDŮ

JOSEF HÁJÍČEK

Zentiva/Výzkumný ústav pro farmacii a biochemii, a.s.,
U kabelovny 130, 10237 Praha 10
josef.hajicek@zentiva.cz

Došlo 11.8.04, přijato 11.10.04.

Klíčová slova: alkaloidy, totální syntéza, Mannichova reakce, dvojná vazba C=N, imin, iminium, *N*-acyliminium, cyklizace, kaskádové/tandemové reakce

Obsah

1. Úvod
2. Rané období
3. Klasické období
4. Období systematického rozvoje
5. Mannichova a příbuzné reakce
6. Mannichova reakce na přelomu století. Výhled

Článek umožňuje stručný náhled do vývoje a současného stavu totální syntézy alkaloidů, přičemž se soustřeďuje na transformace dvojně vazby C=N. Na konkrétních příkladech je ukázáno použití Mannichovy reakce a dalších příbuzných procesů, které reprezentují základní metody syntézy těchto sekundárních metabolitů.

1. Úvod

Alkaloidy představují patrně strukturně nejrozmanitější skupinu přírodních látek¹. Vznik cílené chemie alkaloidů můžeme klást zhruba do počátku 19. století, kdy byly izolovány první alkaloidy v čistém stavu. V mnoha případech však bylo nutno vynaložit enormní množství degra-

dační práce, v průběhu často více než celého století, k tomu, aby byla určena struktura izolovaných bazí. Postupné rozšiřování arzenálu strukturního chemika po 2. světové válce o efektivní metody, jako např. hmotnostní, a zvláště NMR spektroskopii a chiroptické metody, vedlo k nesmírnému urychlení procesu strukturní analýzy. V závěrečných dekádách 20. století izolační práce již prakticky bez výjimky popisují i úplně určené struktury izolovaných alkaloidů, včetně absolutní, nebo alespoň relativní stereochemie.

Obdobný vývoj zaznamenala i syntéza, a zvláště totální syntéza alkaloidů. Její pokrok souvisel s rozvojem teoretické organické chemie, obecné organické syntézy a speciálních metod, zvláště chemií C=N dvojně vazby. Praktická realizace byla podporována dostupnými metodami strukturní analýzy. Některé z publikovaných syntéz alkaloidů patří ke zlatému fondu totální syntézy²⁻⁴.

Základním zdrojem informací o alkaloidech je několik mnohasvazkových monografií⁵⁻⁷, zvláště *The Alkaloids*, založené R. H. F. Manskem. Výborným zdrojem informací nejen o syntéze alkaloidů je referátový časopis *Natural Product Reports*⁸, v němž vychází pravidelně tématicky zaměřené články (přehledový článek je zpravidla označen R^x).

Omezený prostor je důvodem, proč se tento přehled pokouší pouze nastínit možnosti, které v syntéze těchto sekundárních metabolitů představují transformace dvojně vazby C=N. Ze stejného důvodu je v některých případech ve schématech znázorněna pouze sekvence jinak dlouhé totální syntézy; rozšířená verze literatury se zachovaným číslováním je umístěna na webové stránce časopisu Chemické listy (<http://chemicke-listy.vscht.cz>). Přehled používaných zkratk čtenář najde např. v cit.²⁻⁴, případně v citovaných pracích, a 0 °C 1 h → rfl (0,5 h) 2 h znamená, že směs byla nejprve udržována 1 h při 0 °C, potom zahřata během 0,5 h k varu a dále zahřívána k varu 2 h.

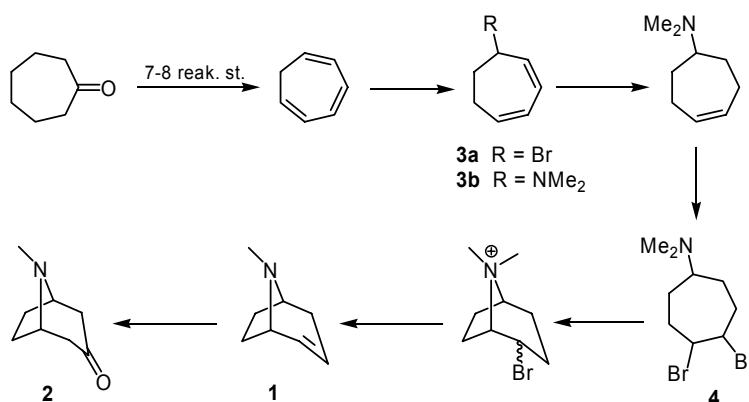


Schéma 1. Historická syntéza tropinonu

2. Rané období

Syntéza alkaloidů se zpočátku koncentrovala na jednodušší typy z praktických důvodů: U komplikovanějších alkaloidů prostě nebyly známy struktury; např. u morfinu trvalo úplné určení struktury 121 let (1804-1925), u strychninu 127 let (1819-1946). Prvním alkaloidem získaným totální syntézou je patrně racemický i opticky aktivní koniin, připravený v roce 1886 Ladenburgem⁹. Vývoj syntéz

alkaloidů ilustruje dobře příklad bicyklického tropanového skeletu. První syntéza tropidinu (1) a tropinonu (2) je poplatná době svého vzniku¹⁰ (konec 19. století), a spočívá v postupném budování skeletu cílové sloučeniny (Schéma 1). Výchozí cykloheptanon byl konvertován v cykloheptatrien a dále přes intermediát 3 v symetrický dibromamin 4; jeho cyklizace vedla přes tropidin (1) k tropanonu (2).

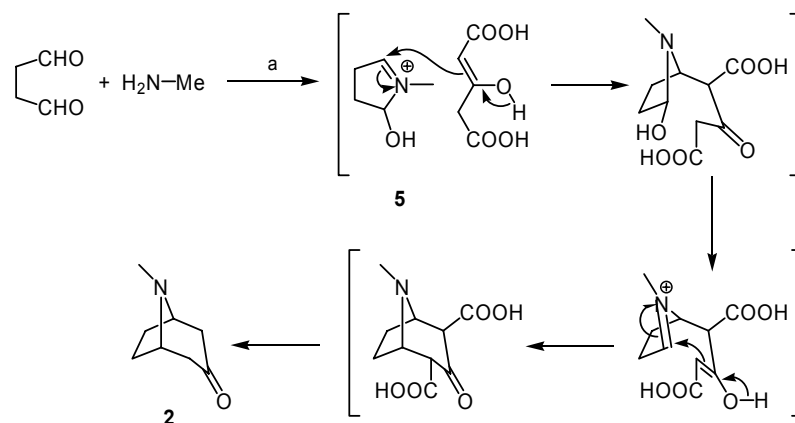


Schéma 2. **Syntéza tropinonu**; činidla a podmínky: a) H₂O, pufr, pH 3–11 (47–86 %)

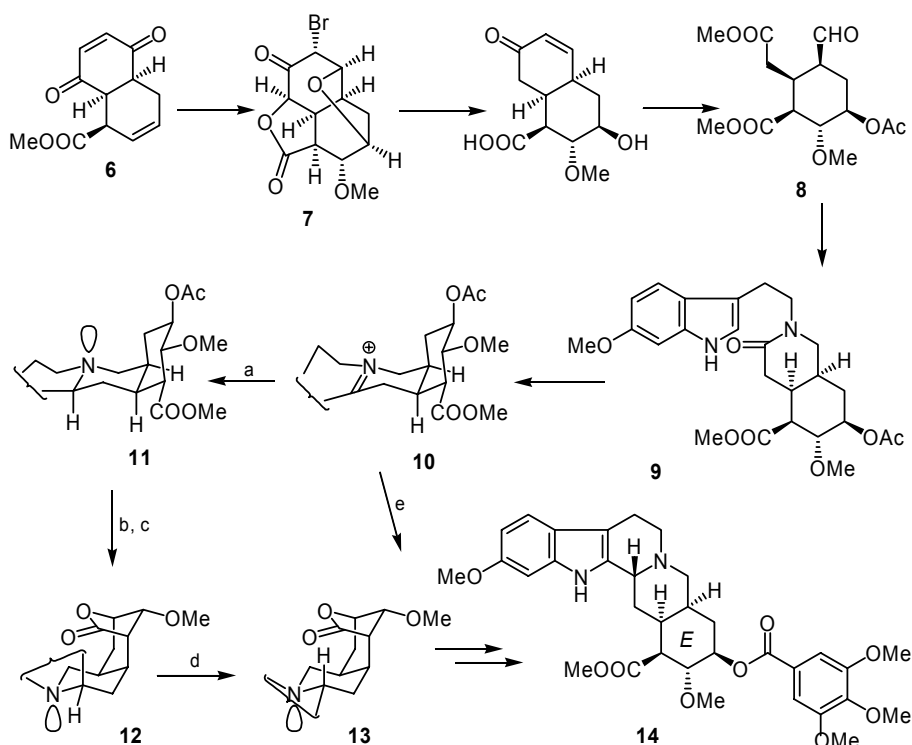


Schéma 3. **Syntéza (-)-reserpinu**; činidla a podmínky: a) NaBH₄, MeOH vod. b) K₂CO₃, MeOH vod., rfl 2 h. c) DCC, py, 100 °C 2 h. d) Me₃C.COOH, xylen, rfl 16 h. e) Zn, HClO₄, Me₂CO, THF, H₂O, rfl 20 min (β-H:α-H 3:1).

3. Klasické období

Následující syntéza tropinonu¹¹ R. Robinsona (z roku 1917) je již na první pohled odlišná. Postupné budování skeletu s použitím „průhledných“ transformací je zde nahrazeno elegantním složením molekuly z jednoduchých stavebních kamenů (Schéma 2). Kondenzace jantarového dialdehydu s methylaminem a následná tandemová Mannichova reakce iminia **5** s kyselinou acetondikarboxylovou (nejprve intermolekulární) poskytla přímo tropinon (**2**) v nízkém výtěžku. Tato totální syntéza, realizovaná na základě úvah o biosyntéze „one-pot“ (R^{12}) způsobem, je současně první biomimetickou alkaloidní syntézou ($R^{13,14}$). Postup byl optimalizován Schöpfem¹⁴, a výtěžek byl zvýšen až na 83 %. Obdobným způsobem byl z glutarového aldehydu získán pseudopelletierin^{15,16}, pozdější aplikace¹⁷.

Touto syntézou začíná období klasické, vymezené z druhé strany přibližně pracemi R. B. Woodwarda a spolupracovníků. Je to období, kdy totální syntéza byla skutečným uměním, kdy výsledek závisel na chemikově umu. Nádhernou ilustrací je Woodwardova syntéza reserpinu¹⁸ (**14**), (Schéma 3). V sérii pečlivě plánovaných experimentů byl [4+2] cykloadukt **6** konvertován v lakton **7**, mající všechna chirální centra budoucího kruhu E reserpinu se správnou relativní konfigurací. Lakton **7** byl transformován v aldehyd **8**, a posléze přes piperidon **9** v imoniou sůl **10**. Redukce (NaBH_4) poskytla očekávatelný, avšak nežádoucí stereoisomer **11**. Jeho epimerizace na C-3 bylo dosaženo po změně konformace ($\rightarrow$ lakton **12**) a následnou kyselou isomerizací (R^{19}); získaný 3- β H isomer **13** byl potom konvertován, s využitím optického štěpení, v (-)-reserpin (**14**). Později bylo zjištěno²⁰, že redukce

imoniových solí **10** kovy v kyselém prostředí vede přímo k produktům s 3- β H konfigurací.

V tomto období byly mj. dokončeny syntézy racemického fysostigminu (Julian)^{21,22}, morfinu (Gates)²³ a strychninu (Woodward)²⁴.

4. Období systematického rozvoje

Totální syntéza kobyrové kyseliny (a vitaminu B_{12}), společné dílo týmů Woodwarda a Eschenmosera²⁵, představuje i po více než třech desetiletích jeden z největších úspěchů totální syntézy přírodních látek; v souvislosti s touto syntézou byly vyvíjeny nové postupy a byla formulována pravidla zachování orbitalní symetrie (Woodward, Hoffmann).

Přibližně zde začíná dosud neukončené období systematického a bouřlivého rozvoje syntetických metod a stereoselektivních reakcí²⁶. Často jsou to právě požadavky totální syntézy, které vedou k vývoji nových, nebo variant známých reakcí a transformací^{27–29}. Na významu nabývají kaskádové/tandemové sekvence, v nichž reakce proces zahajující je následována jednou, nebo více reakcemi stejného, nebo odlišného typu^{30–33}. Je zřetelná tendence syntetizovat látky opticky aktivní. S tím souvisí bouřlivý rozvoj enantioselektivních, s výhodou katalytických procesů, a využívání chirálních ligandů³⁴ a stavebních kamenů³⁵.

Toto období přineslo Coreyho retrosyntetickou analýzu³⁶, plánování syntéz bylo převedeno na racionální základ. Rozvíjí se rovněž Mannichova reakce a příbuzné procesy^{37,38}, které patří k základním metodám syntézy alkaloidů³⁹.

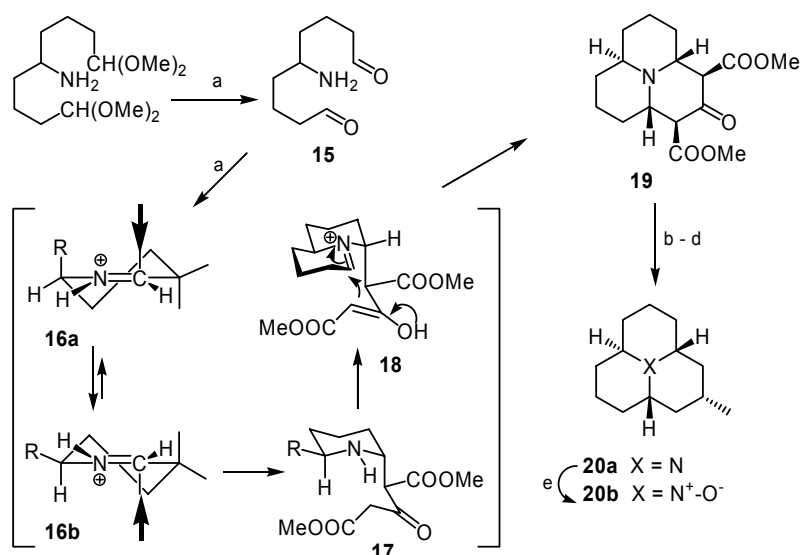


Schéma 4. Syntéza kokcinellinu; činidla a podmínky: a) HCl vod. (pH 1), rt 1 h, potom pH $\rightarrow$ 5,5 (25% NaOH vod. + citráto-fosfátový pufr), potom $\text{O}=\text{C}(\text{CH}_2\text{COOMe})_2$, rt 24 h, potom pH $\rightarrow$ 8, rt 24 h (75 %). b) NaCl , H_2O (3,5 ekv.), DMF, rfl 4 h (56 %). c) $\text{Ph}_3\text{P}=\text{CH}_2$, Et_2O , rt 1 h $\rightarrow$ rfl 0,5 h (82 %). d) H_2 , 10% Pd/C , MeOH , rt 8 h. e) $m\text{-CPBA}$, CH_2Cl_2 , 0 °C 8 h (64 % 2 stupně)

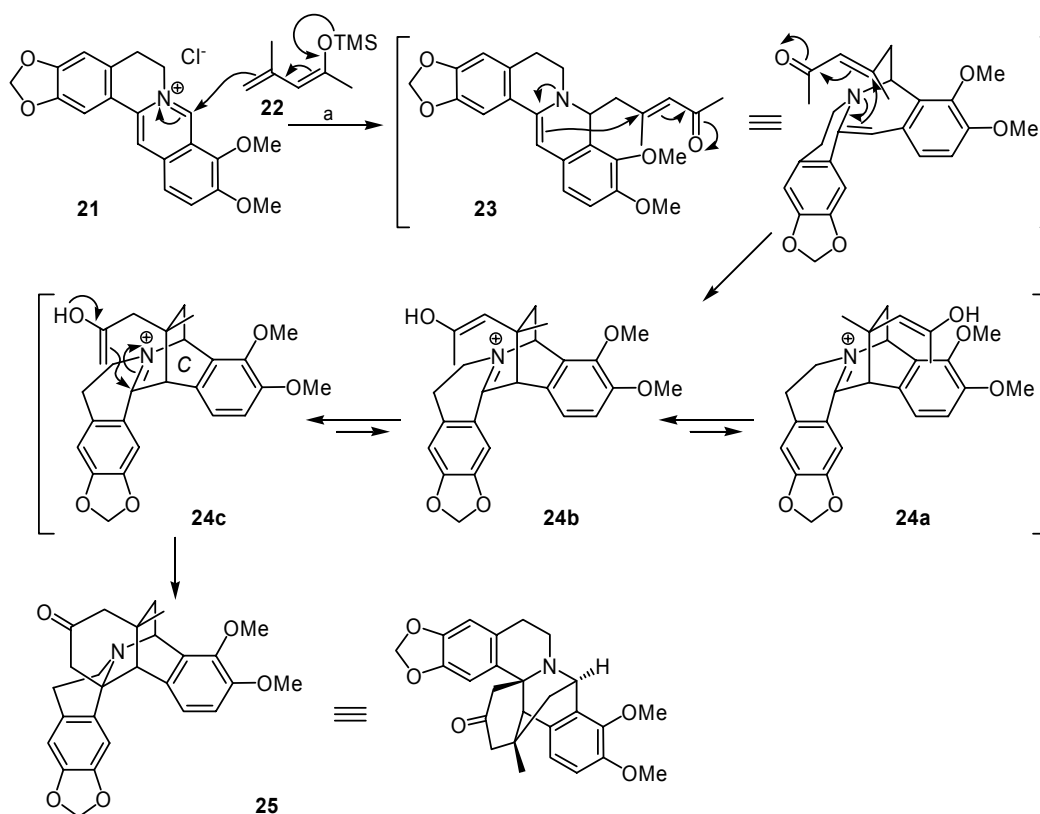


Schéma 5. Syntéza (±)-karačinu; činidla a podmínky: a) DMSO, 100 °C (66 %)

5. Mannichova a příbuzné reakce

Pokročilejší variací chemie ukázané ve Schématu 2, a ilustrací uplatnění stereochemických vlivů v Mannichových procesech, je Stevensova syntéza⁴⁰ kokcinelinu (20b) a prekocicinelinu (20a), (Schéma 4). Aminodialdehyd **15** cyklokondenzuje za vzniku iminia, které reaguje přednostně v židličkovém tranzitním stavu **16b**, v němž se vyvíjí menší pnutí během ataku nukleofilu. Obdobně se sterické a stereoelektronické efekty (R^{41}) uplatňují i v následující intramolekulární adici nukleofilu v bicyklickém iminiu (**18** → **19**); viz R^{42} .

Pozornost si zaslouží i mnohé další totální syntézy založené na Mannichově cyklizaci, jako např. lucidulinu⁴³, lykopodinu⁴⁴ a porantherinu^{45,46}. Efektivní „one-pot“ syntéza karačinu⁴⁷ (**25**) bicykloanulací berberinu (**21**) se silyloxydienem **22** je založena na delikátní bilanci různých faktorů v Mannichově cyklizaci, (Schéma 5). Intermediát **23** podlehl intramolekulární Michaelově adici enaminu na enon a poskytl primárně směs imonií **24a** a **24b** s vaničkovou konformací kruhu C; v důsledku toho se neuplatní energetický faktor, který by jinak vedl k preferenční *anti*-adici v židličkovém tranzitním stavu. Navíc, kinetický enol **24c** je spotřebováván následnou Mannichovou kondenzací vedoucí k **25**, produktu jinak

nevýhodné *syn*-adice.

Z preparativního hlediska je celý proces velmi jednoduchý, neboť prosté zahřívání berberinu (**21**) s **22** poskytuje racemický karačin (**25**) ve výtěžku 66 %.

Elegantní konstrukce tetracyklického ketonu **31** ve Winklerově syntéze (±)-manzaminu A⁴⁸ je založena na sekvenci [2+2] cykloadice a následné násobné retro-Mannichovy/Mannichovy reakce (Schéma 6). Vinylogický amid **26**, získaný adicí diynonu na azocin, fotocykloval za vzniku [2+2] cykloaduktu **27**. Cyklobutan (β-amino-keton) podlehl fragmentaci a intermediární enol okamžitě atakoval iminium **28**. Oxan **29** fragmentoval působením py/AcOH za vzniku iminia **30**; závěrečná Mannichova cyklizace umožnila izolaci tetracyklu **31** v celkovém 20% výtěžku.

Brilantní výstavba klíčového intermediátu v Magnusově novém přístupu k syntéze komplexních indolových alkaloidů⁴⁹ je založena na kaskádě iminio-vých cyklizací⁵⁰. Syntéza schizozyanového alkaloidu (-)-strepeliopinu⁵¹ (**39**) je založena na pravděpodobně biomimetickém reduktivním přesmyku⁵² indoleninu **35**, (Schéma 7). (+)-18-Methylenvinkadifformin (**34**), přístupný „one-pot“ kondenzací aminu **32** s aldehydem **33**, adaptací klasického postupu dle Kuehneho, a následným optickým štěpením, byl nekysle⁵³ dekarboxylován. Získaný

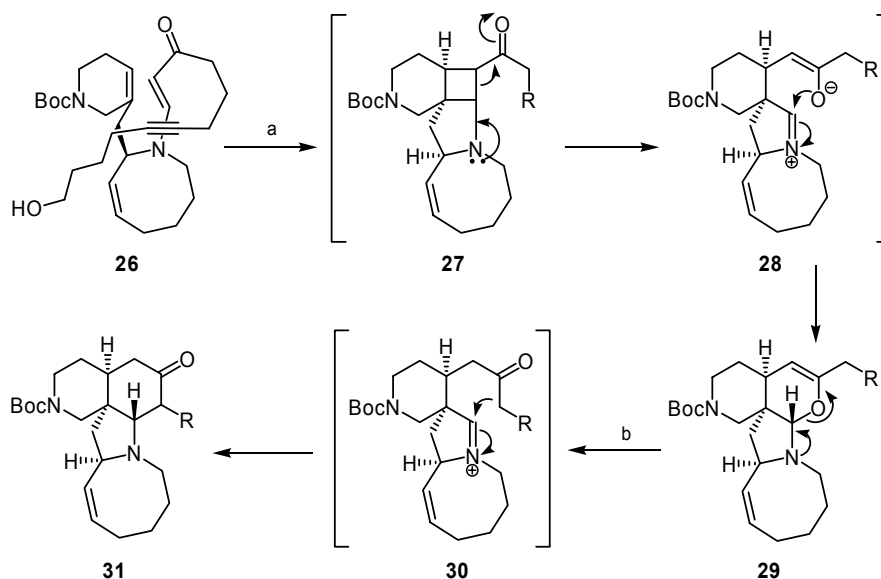


Schéma 6. Sekvence ze syntézy (±)-manzaminu **A**; činidla a podmínky: a) $h\nu$, MeCN. b) AcOH, py, MeCN, r.t. 4 h (20 % 2 stupně)

indolenin **35** byl v kyselém prostředí v rovnováze s iminiem **36**, které bylo atakováno stereoselektivně indolem, a generované iminium **37** okamžitě redukováno z více přístupné α -strany (Zn/CuSO₄, AcOH) za vzniku indolinu **38a**, izolovaného jako formanilid (-)-**38b**; během procesu byla vytvořena 3 chirální centra, a jejich absolutní konfigurace efektivně řízena uhlíkem C20. Obdobný přesmyk je základem biomimetické syntézy eburnanových alkaloidů⁵⁴. Předpokládané intermediáty typu **37** je možno za jistých podmínek zachytit a ve stabilizované podobě izolovat⁵⁵.

Intermediární iminia příbuzná **37** se uplatnila i v totální syntéze protinádorově účinných bisindolových alkaloidů⁵⁶. Schéma 8 ilustruje závěrečné stupně Fukuyamovy *de novo* totální syntézy (+)-vinblastinu (**39**, VLB)⁵⁷, která zahrnuje i nový radikálový postup konstrukce indolového jádra (**40** → **41**). Indol **42**, jehož 11-členný kruh byl uzavřen regioselektivním otevřením oxiranu **41** (82 %), byl elektrofilně chlorován za vzniku chlorakrylátu **43**. Působením TFA byl chlorderivát ionizován a generovaný konjugovaný akrylát **44** bezprostředně napaden vindolinem jako nukleofilem v α -poloze (obrácená regioselektivita). Takto byl izolován bis-indol **45** jako jediný stereoisomer v 97% (!) výtěžku z **42**. Odchráněním a uzavřením piperidinového cyklu byla dokončena syntéza (+)-VLB (**46**), která zahrnuje rovněž totální syntézu potřebného (-)-vindolinu⁵⁸; viz rovněž⁵⁹. Popsaný proces byl užit i v Kuehneho⁶⁰ a Magnusově⁶¹ totální syntéze VLB. V Potierově biomimetické parciální syntéze⁶² těchto bis-indolů byla konjugovaná iminia typu **44** generována fragmentací *N*-oxidu kataranthinu (Potierova-Polonovského reakce)⁶³; viz rovněž⁶⁴ pro alternativní syntézu.

Brilantní enantioselektivní syntézu alkaloidu (-)-aspidofytinu (**54**) zveřejnil Corey⁶⁵ (Schéma 9). Acetát **47**,

získaný CBS redukcí příslušného ketonu, byl konvertován v několika krocích v dialdehyd **48**. Jeho kondenzace s tryptaminem iniciovala kaskádu iminiových cyklizací, v níž primárně vzniklé dihydropyridinium **49** bylo nejprve atakováno arylem z méně bráněné α -strany (Pictet-Spengler), a potom rezultující indoleninium **50** allylsilánem z β -strany. Celý proces byl zakončen redukcí enaminu (NaBH₃CN) a pentacyklický ester **51** byl izolován v 66% výtěžku; stejně jako ve Schématu 7, přítomné chirální centrum (C20) indukovalo korektní konfiguraci 3 generovaných center chiralit. Za zmínku stojí i vysoce efektivní tvorba butanolidového cyklu, která je založena na efektivní tvorbě iminia **52** pomocí K₃[Fe(CN)₆] (**51** → **53** 92 %); další totální syntéza alkaloidu⁶⁶.

Na kaskádě nukleofilní adice na *N*-alkylpyridiniové soli a následné Pictetově-Spenglerově cyklizaci (R⁶⁷) je založen dnes již klasický Wenkertův přístup k syntéze indolových alkaloidů⁶⁸; pro příbuznou chemii viz⁶⁹. Cyklizace tohoto typu byly opakovaně užity v syntéze racemických⁷⁰ i opticky aktivních⁷¹ saframycinů. Rovněž dihydropyridiny se uplatňují jako intermediáty⁷². Klíčovým krokem v syntéze (+)-kannabisativinu je adice kovového enolátu na chirální *N*-acylpyridiniovou sůl⁷³.

Při adicích se mohou uplatnit i vinylsilany, allylsilany a propargylsilany⁷⁴, čehož bylo využito např. v syntéze pumiliotoxinů⁷⁵.

Mannichova reakce může navazovat na předřazenou reakci, a posouvat tak rovnováhu ve prospěch produktu. Na kombinaci azonia-Copeho přesmyku a Mannichovy reakce (R⁷⁶) je založena Overmanova syntéza (-)-strychninu⁷⁷ (**62**, Schéma 10); pro přehled syntéz tohoto alkaloidu viz R⁷⁸. Optická aktivita byla indukována již v úvodu syntézy: Racemický diacetát **56b**, připravený Pd-kataly-

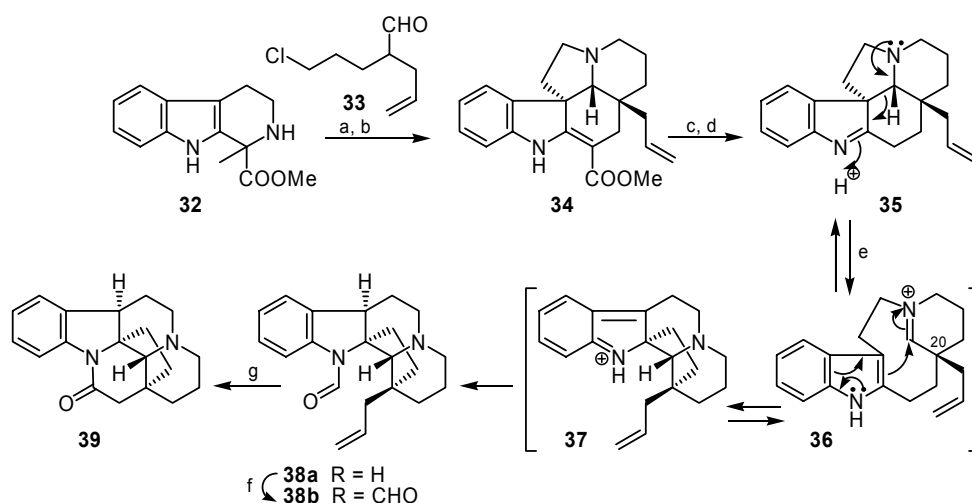


Schéma 7. **Syntéza (-)-strepeliopinu**; činidla a podmínky: a) TsOH (kat.), PhMe, rfl 110 h, potom DBU, rfl 15 h (50 %). b) kyselina (+)-vinná, EtOH, (97 %). c) KOH, EtOH, rfl 2 h. d) PhH, rfl 1 h (92 % 2 stupně). e) Zn, CuSO₄·5H₂O (kat.), AcOH, 60 °C → 102 °C 2 h, potom Zn, CuSO₄·5H₂O (kat.), 102 °C 2 h. f) HCOOH, Ac₂O, 10 °C → rt 9 h (34 % 2 stupně). g) O₃, 1N HCl vod., MeOH, rt, potom 30% H₂O₂ vod., rt 15 h (35–49 %)

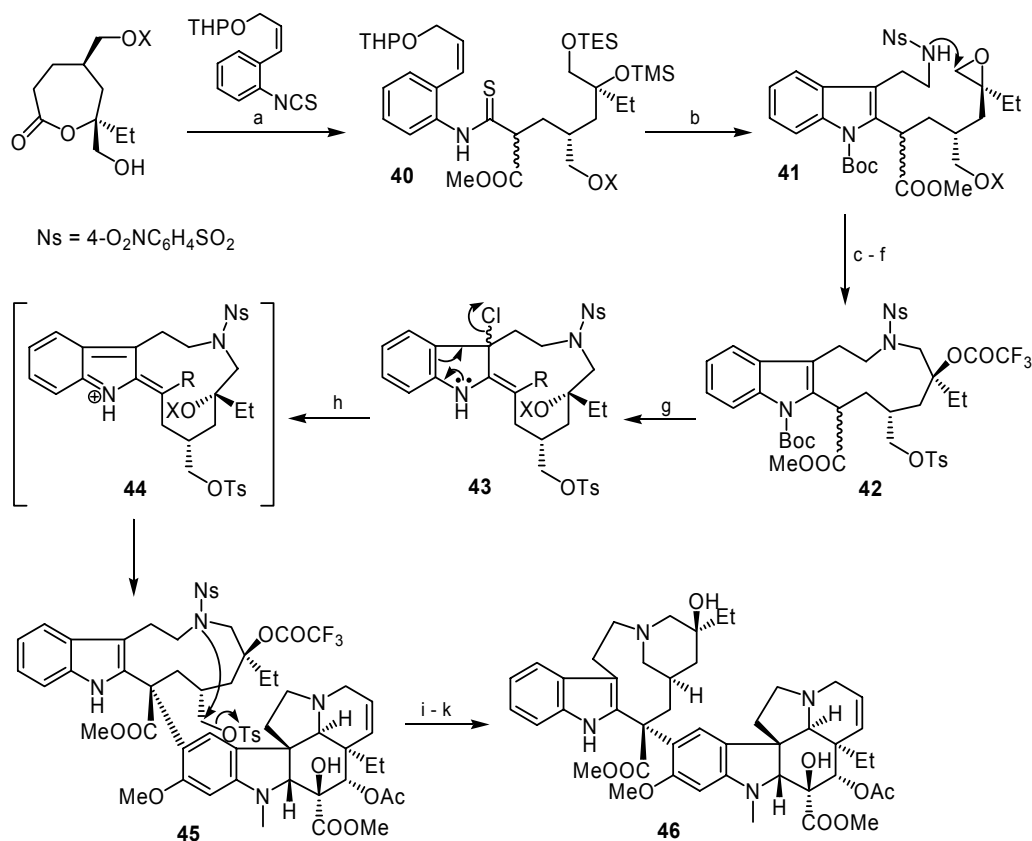


Schéma 8. **Syntéza (+)-vinkaleukoblastinu (VLB)**; činidla a podmínky: a) LDA, THF, -78 °C → 0 °C (76 %). b) Bu₃SnH, Et₃B, THF, rt (67 %); + 5 dalších stupňů. c) K₂CO₃, DMF, 90 °C (82 %). d) TFA, CH₂Cl₂, rt (85 %). e) TsCl, Me₂N(CH₂)₃NMe₂, MeCN/PhMe, rt (88 %). f) TFAA, py, CH₂Cl₂, rt (90 %). g) *t*-BuOCl, CH₂Cl₂, 0 °C. h) (-)-vindolin, TFA, CH₂Cl₂, 0 °C → rt (97 %). i) Et₃N, CH₂Cl₂, rt (kvant.). j) HSCH₂CH₂OH, DBU, MeCN, rt (76 %). k) NaHCO₃, *i*-PrOH vod., rt (66 %)

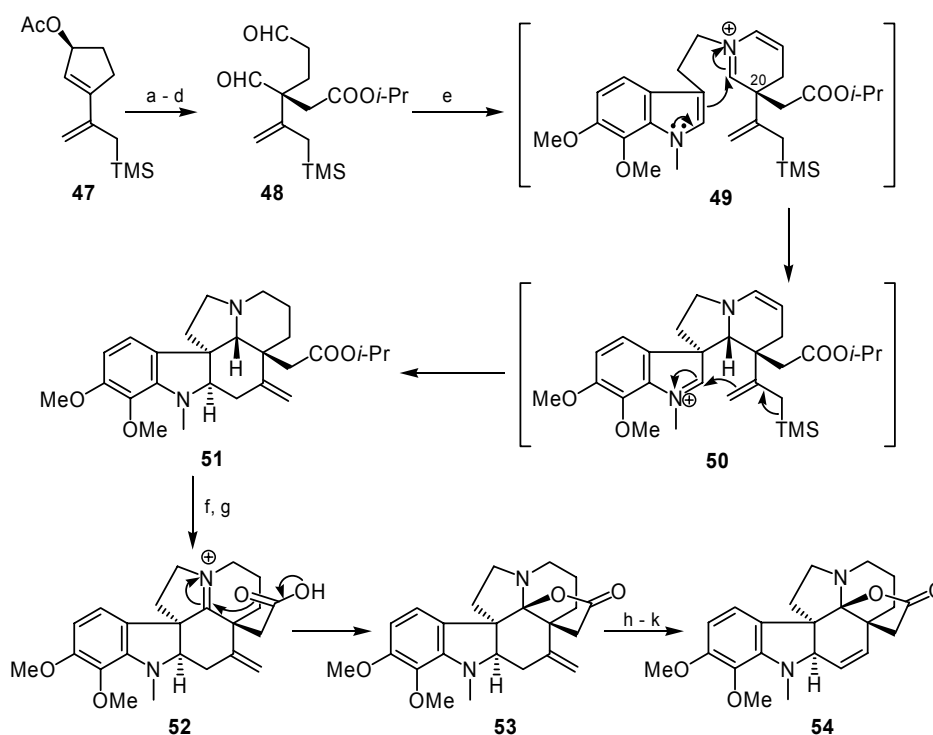


Schéma 9. **Syntéza (-)-aspidofytinu**; činidla a podmínky: a) LDA, THF, HMPA, -78°C , potom TBDMSCl, -78°C 15 min $\rightarrow$ rt 1 h $\rightarrow$ rfl 3 h. b) EDCI, DMAP (kat.), *i*-PrOH, 40°C 3 h (57 % 2 stupně). c) OsO_4 (0,05 ekv.), NMO, Me_2CO , 0°C $\rightarrow$ rt 6 h (57 %). d) NaIO_4 , THF/ H_2O (4:1), rt 35 min (98 %). e) 6,7-Dimethoxy-*N*-methyltryptamin, MeCN, rt 5 min, potom TFAA, 0°C 2 h, potom NaBH_3CN , 0°C $\rightarrow$ rt 30 min (66 %). f) NaOH vod., EtOH, 75°C 20 h (88 %). g) $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, NaHCO_3 , *t*-BuOH/ H_2O (1:2), rt (92 %). h) OsO_4 (1 ekv.), DMAP (2 ekv.), *t*-BuOH/ H_2O (1:2), rt 5–10 min, potom Na_2SO_3 . i) $\text{Pb}(\text{OAc})_4$, AcOH, CH_2Cl_2 , -20°C (71 % 2 stupně). j) KHMDS, THF, -78°C 30 min, potom PhNTf_2 , -78°C (54 %). k) Bu_3SnH (8 ekv.), $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (0,2 ekv.), THF, rt 1 h (86 %)

zovanou *syn*-1,4-adicí kyseliny octové na epoxycyklo-penten **55**, byl enantioselektivně hydrolyzován působením EEAC (pro biotransformace viz R^{79}). Získaný monoacetát (1*R*,4*S*)-**56c** byl konvertován v karbonát **56d**, přestavený v sérii reakcí na epoxid **57**. Otevření epoxidu poskytlo piperidin **58**, konvertovaný interakcí s formaldehydem v iminium **59a**. Následující stereoselektivní azonia-Copeův přesmyk vedl k isomernímu iminiu **59b**, které bylo bezprostředně atakováno C-nukleofilem (přesmykem generovaným enolem) za vzniku tricyklického aminoketonu ve výtěžku 98 % z aminu **58**! Keton **60** byl transformován ve dvou stupních v anilinoakrylát **61**, a posléze přes Wielandův-Gumlichův aldehyd v přírodní (-)-strychnin (**62**). Postup byl rovněž aplikován v syntéze (+)-strychninu⁸⁰, aspidospermanových⁸¹, strychnanových⁸² i melodanových⁸³ bazí; byl rovněž klíčovým procesem v syntéze α -allokainové kyseliny⁸⁴ a antibiotika preussinu⁸⁵.

Adice vinylogického ($\text{R}^{86,87}$) nukleofilu **65** na C=N dvojnou vazbu dihydro- β -karbolinu **64** je úvodním krokem Martinovy syntézy⁸⁸ analogu akuammicinu **61**, a tudíž biomimetické formální syntézy racemického strychninu ($\pm$)-(**62**), (Schéma 11). Protože siloxydien **65** není dostatečně reaktivní, byla reakce prováděna v přítomnosti **66b**,

a probíhala tak pravděpodobně přes silně elektrofilní acyliminium (80 %). Získaný akrylaldehyd (1-oxadien) **67** podlehl intramolekulární hetero [4+2] cykloadici a získaný cykloadukt **68** (85 %) byl konvertován v indol **69b**, jehož chlorací vznikla směs 3-chlorindolenií **70**. Pouze isomer **70b** podlehl působením silné báze transformaci (přes **71**) ve sloučeninu **61**. S využitím krotonylchloridu (**66a**) byl obdobně připraven ($\pm$)-akuammicin⁸⁹ (**63**).

Pěknou ilustraci opakované adice vinylogického nukleofilu (2-silyloxyfuranu) na C=N dvojnou vazbu (jedna z nich *N*-acyliminiového typu, druhá generována dekarboxylací α -aminokyseliny) je možno nalézt⁹⁰ v enantioselektivní syntéze (+)-krominu. Na generaci iminií dekarboxylací 5-substituovaných prolinů je založena rovněž enantioselektivní syntéza (+)-anatoxinu A^{91} (R^{92}), (+)-epibatidinu⁹³ a (+)-ferrugininu⁹⁴; příbuzný postup byl aplikován v syntéze (+)-apovinkaminu⁹⁵.

Klasickým příkladem užití *N*-acyliminiových cyklizací ($\text{R}^{96,97}$) je syntéza ($\pm$)-lykopolinu (**77**) podle Storka⁹⁸, otcé enaminové chemie, (Schéma 12). *trans*-3,5-Disubstituovaný cyklohexanon **72** poskytl reakcí pyrrolidinového enaminu s akrylamidem enamidový isomer **74** (nízký výtěžek 20–25 % v důsledku neregioselektivní tvorby **73**). Přednostní *para*-adici arylu v odvozeném acyliminiu **75**

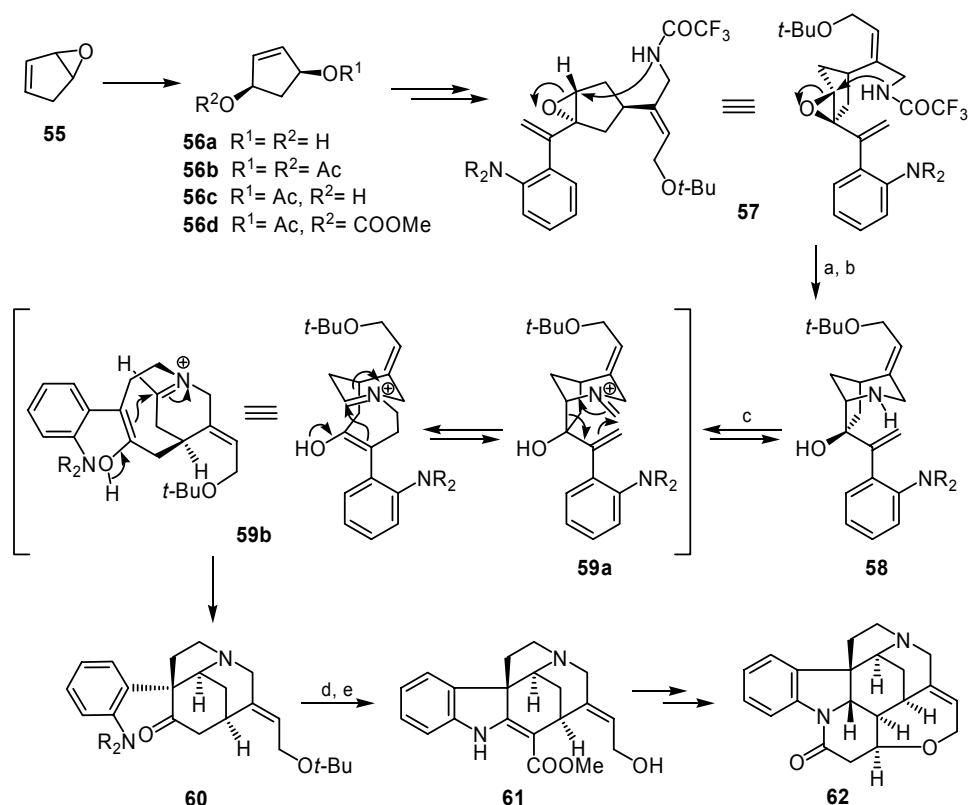


Schéma 10. **Syntéza (-)-strychninu**; činidla a podmínky: a) NaH, PhH, rt → 100 °C 48 h. b) KOH, EtOH/H₂O (5:1), 70 °C 3 h (75 % 2 stupně). c) (CH₂O)_n, Na₂SO₄, MeCN, rfl 10 min (98 %). d) LDA, THF, -78 °C → 0 °C 30 min, potom NC.COOMe, -78 °C 2 h, potom H₂O, -78 °C → rt. e) 10% HCl/MeOH, rfl 12 h (70% 2 stupně)

byl získán tetracyklický laktam **76** (55 % + 29 % isomer). Zde, stejně jako ve Woodwardově syntéze strychninu²⁴, bylo degradace elektronově bohatého arylu využito k výstavbě potřebného substituentu.

Generaci *N*-acyliminiového intermediátu během kaskádového procesu (R⁹⁹) ilustruje Padwova syntéza¹⁰⁰ erythrinanového skeletu (Schéma 13). Sulfoxid **78** podlehl působením TFAA Pummererově reakci (R¹⁰¹); generované thionium bylo atakováno amidickým karbonylem za vzniku amidofuranu **79** (R¹⁰²), který poskytl intramolekulární [4+2] cykloadici intermediát **80**. Jeho bezprostřední isomerizace přítomným BF₃·OEt₂ vedla přes enamid **81** k acyliminiu **82**, které bylo atakováno arylem. Transformace proběhla stereoselektivně s výtěžkem 83 %. Spirocyclický laktam **83** byl posléze konvertován v (±)-erysotramidin (**84**), příbuzná sekvence byla užita např. v syntéze (±)-jamtinu¹⁰³; enamidů typu **81** bylo využito v syntéze dendrobinu¹⁰⁴. Syntéza (±)-aspidospermidinu je založena na kaskádové cyklizaci acyklického ketoaldehydu¹⁰⁵.

Redukce imoniových solí již byla zmíněna u reserpinu (Schéma 3). Redukce 3,4,5,6-tetrahydropyridinu je klíčovým stupněm Storkovy stereoselektivní syntézy (-)-chininu¹⁰⁶ (**92**), (Schéma 14). Tato syntéza svou celkovou strategií připomíná dnes již klasickou syn-

tézu (±)-chininu (Uskoković; Hoffmann-La Roche)¹⁰⁷, která stereosektivní nebyla, neboť za zvolených podmínek (AcOH, NaOAc) byla konjugovaná adice ve vinylocholinu **89** odvozeném z acetátu **88** reverzibilní, a vedla ke směsi deoxychininu (**90**) a deoxychinidinu (**91**) v poměru 43:57. Ve Storkově syntéze byla epimerní směs alkoholů **94** oxidována na keton, který za podmínek Staudingerovy reakce cyklizoval za vzniku tetrahydropyridinu **95** (69 %). Ten zaujímal přednostně konformaci s oběma substituenty s pseudoekvatoriální orientací a byl podle předpokladu redukován za vzniku piperidinu **95** jako jediného stereoisomeru (91 %). Z něj odvozený deoxychinin (**90**) byl konvertován v (-)-chinin (**92**) modifikovaným Uskokovićovým postupem, na jehož vysoké stereoselektivě (14:1) se podílel patrně chinuklidinový dusík (78 %).

Stereoselektivní redukce byla široce využívána např. v syntéze eburnanových alkaloidů, kde redukce tetracyklických imonií byla aplikována v syntéze (+)-vinkaminu¹⁰⁸. U téměř planárních pentacyklických imoniových solí jsou redukcí získávány nepřírozené *trans*-D/E eburnany¹⁰⁹ (sterická kontrola angulárním ethylem), zatímco redukce rozpouštějícími se kovy stereochemický průběh obrací¹¹⁰. Klíčovým stupněm v syntéze¹¹¹ monomorinu I je redukce imoniových specií s využitím stereoelektronic-

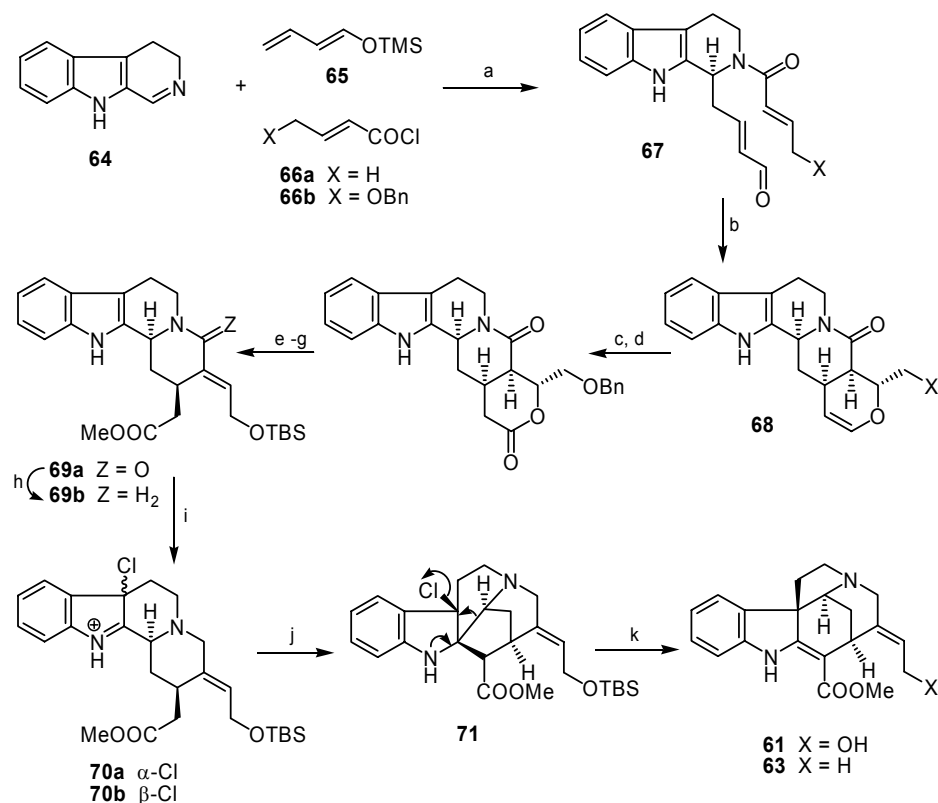


Schéma 11. **Formální syntéza racemického strychninu**; činidla a podmínky: a) **66b**, THF, $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 h $\rightarrow$ rt 1 h (79 %). b) mesitylen, $160\text{ }^{\circ}\text{C}$ 3 d (85 %). c) 70% HClO_4 vod. (kat.), THF/ H_2O (5:1), $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 12 h (93 %). d) *trans*- $\text{PhCH}=\text{CHAc}$, $(\text{Ph}_3\text{P})_3\text{RuCl}_2$, Et_3N , PhMe , rfl 24 h (79 %). e) H_2 , 20% $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$, AcOEt , EtOH , rt 5 h (67 %). f) NaOMe (3 ekv.), MeOH , rt 24 h, potom TsOH (5 ekv.), $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 h $\rightarrow$ rt 5 h (74 %). g) TBSCl , DMAP , py , rt 24 h (71 %). h) $\text{Me}_3\text{O}^+\text{BF}_4^-$, 2,6-di-*t*-butylpyridin, CH_2Cl_2 , rt 24 h, potom NaBH_4 , MeOH , $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 min (83 %). i) SnCl_4 , PhMe , $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 min, potom *t*- BuOCl , $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 min. j) LiHMDS , THF, $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 min $\rightarrow$ rt 3 h (26 %). k) 2N HCl , MeOH , rt přes noc (83 %)

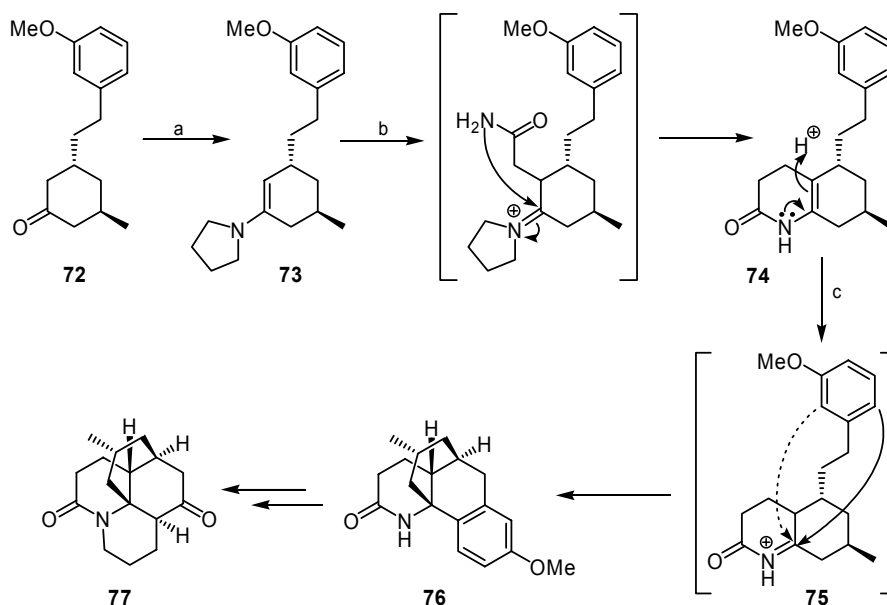


Schéma 12. **Syntéza (±)-lykopenodinu**; činidla a podmínky: a) pyrrolidin. b) $\text{CH}_2=\text{CHCONH}_2$, dioxan, rfl přes noc, potom H_2O , rfl 2 h (**74** 20–25 % + isomer). c) 80% $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{HCOOH}$ (1:1), rt 20 h (**76** 55 % + isomer 29 %)

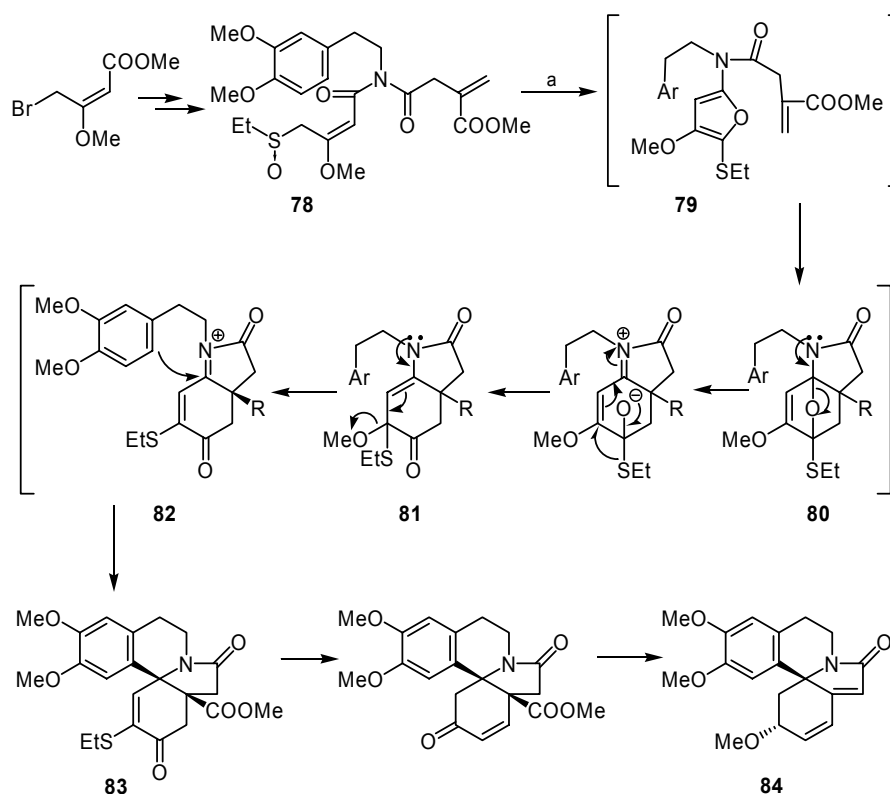


Schéma 13. **Syntéza (±)-erysotramidinu**; činidla a podmínky: a) TFAA, Et₃N, CH₂Cl₂, –78 °C 10 min, potom BF₃·OEt₂, → rt 30 min → rft 20 h (83 %)

kých efektů; obdobné efekty se uplatnily při adici kyanidového aniontu a následné reakci Grignardových činidel s resultujícími aminonitryly¹¹².

Cyklické α-kyanaminy, odvozené od fenyglycinolu, jsou užitečné chirální syntony, které byly využity v asymetrické syntéze pestré škály alkaloidních typů (Husson, tzv. CN (*R,S*) metoda)¹¹³. Strategie se uplatnila např. v syntéze (+)-ferrugininu¹¹⁴, (–)-adalinu a (–)-eufokocininu¹¹⁵, a rovněž obou enantiomerů spirocyklického isonitraminu¹¹⁶. Schéma 15 ukazuje její užití v přípravě alkaloidu (+)-tetraonerinu-8 (**104**)¹¹⁷, v níž je dvakrát užito stereoselektivní alkylace aminonitrilu (**97** → **98** a **102** → **103**), následované, opět vysoce stereoselektivní, redukcí získaných produktů. Pozornost si zaslouží i elegantní transformace aminu **99** v tricyklický aminonitril **102**; tato „one-pot“ konverze, spočívající v ko-kondenzaci dvou aminoaldehydů, poskytla látku **102** jako výhradní stereoisomer v 84% výtěžku! Ve variantě postupu jsou univerzálními intermedii odpovídající laktamy¹¹⁸. Fenylyalaninol je rovněž využitelný v těchto strategiích a může být zabudován do molekuly, jak demonstruje syntéza erythrinanového skeletu¹¹⁹, probíhající přes acyliminina typu **82**.

Při konstrukci alkaloidních skeletů se uplatňují v adicích na C=N dvojnou vazbu i *N*-nukleofily, jak bylo již zmíněno v souvislosti s chininem. Adice anilinu je klíčovým krokem tvorby *N*-acylaminalové skupiny v totální

syntéze (±)-isoschizogaminu¹²⁰, z příbuzného enamidu byl vybudován alkaloid (±)-vallesamidin¹²¹. Přímocárý přístup k syntéze (–)-fysostigminu C-3 methylací tryptofanových derivátů a následným zachycením indoleninlia dusíkem se podařilo realizovat¹²² pomocí Coreyho-Kimova činidla (MeSCH₂Cl); pro příbuzný přístup s využitím aziridinů (R¹²³) viz¹²⁴.

Kapitolu uzavírá dominová sekvence reakcí, která byla použita^{125,126} Heathcockem při konstrukci skeletu dafnilyllových alkaloidů. Strategii ilustruje biomimetická syntéza (±)-methyl-homosekodafnilyllátu (**112**)¹²⁷, (Schéma 16). Pyridin **106a** podlehl působením kyseliny octové hetero [4+2] cykloadici v odvozeném 2-azoniadienu **107a**, a získané iminium **108a** bylo atakováno olefinem (aza-Prinsova reakce) za vzniku pentacyklického aminu **110** v celkovém 83% výtěžku z alkoholu **105**. Během transformace byly generovány 3 cykly a stereoselektivně 5 chirálních center! V případě *N*-methyliminiové soli **106b** (≡ **107b**) podlehl karbokation **109b**, generovaný aza-Prinsovou cyklizací z iminia **108b**, hydridovému přenosu z *N*-methylu (nebo enová reakce?); hydrolýzou byl získán isopropyl-amin **111** ve výtěžku 75 %! Aminy **110** a **111** byly konvertovány v (±)-methyl-homosekodafnilyllát (**112**); (–)-**112** a (–)-sekodafnifillin¹²⁸. Tato strategie byla využita i v syntéze dafnilaktonu A (**113**)¹²⁹ a (±)-bukittingginu¹³⁰; R¹³¹ zahrnuje i odlišné přístupy k syntéze těchto alkaloidů.

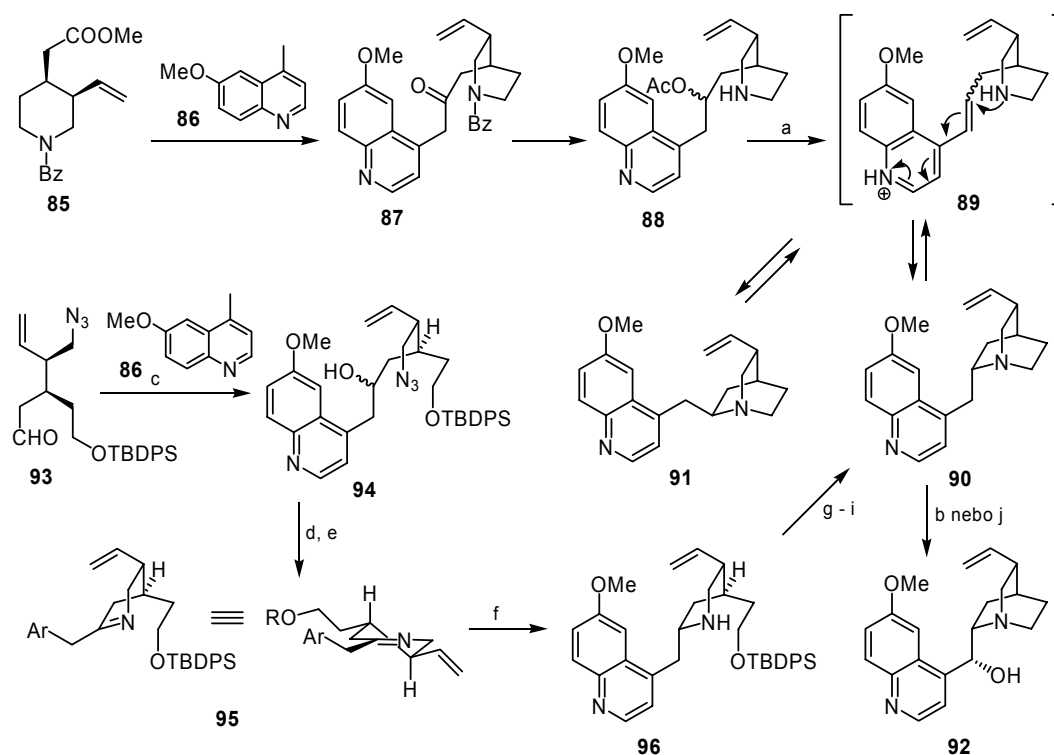


Schéma 14. **Syntéza (+/-)- a (-)-chininu**; činidla a podmínky: a) AcOH, NaOAc, PhH, rfl 14 h (79 %; **90:91** 43:57). b) O₂, KO^t-Bu, DMSO/*t*-BuOH (4:1), 20 °C 9 min ((±)-**92** 32 % + chinidin 40 %). c) **86**, LDA, THF, -78 °C → 0 °C 15 min, potom **93**, -78 °C 15 min → 0 °C 20 min (70 %). d) (COCl)₂, Et₃N, DMSO, -78 °C 1 h (85 %). e) Ph₃P, THF, rfl 3 h (81 %). f) NaBH₄, MeOH/THF (1:1), rt 3 h (91 %). g) 40% HF vod., MeCN, rt 1 h (95 %). h) MsCl, py, CH₂Cl₂, rt přes noc. i) MeCN, rfl 3 h (68 % 2 stupně). j) O₂, NaH, DMSO, 45 min ((-)-**92** 78 %)

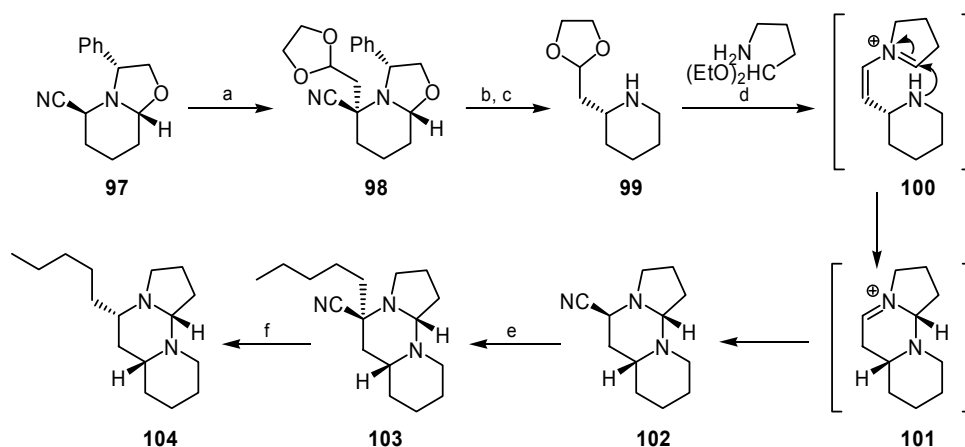


Schéma 15. **Syntéza alkaloidů CN(RS) metodu**; činidla a podmínky: a) (CH₂O)₂CHCH₂Br, LDA, HMPA, THF, -78 °C (84 %). b) NaBH₄, EtOH, rfl 2 h (kvant.). c) H₂, 10% Pd/C, MeOH, 40 min (81 %). d) HCl vod., rt přes noc, potom H₂NCH₂CH₂CH₂CH(OEt)₂, KCN, pH 2–3, rt 2 h (84 %). e) *n*-C₅H₁₁Br, LDA, HMPA, THF, -78 °C (61 %). f) Na, NH₃ (l) (97 %)

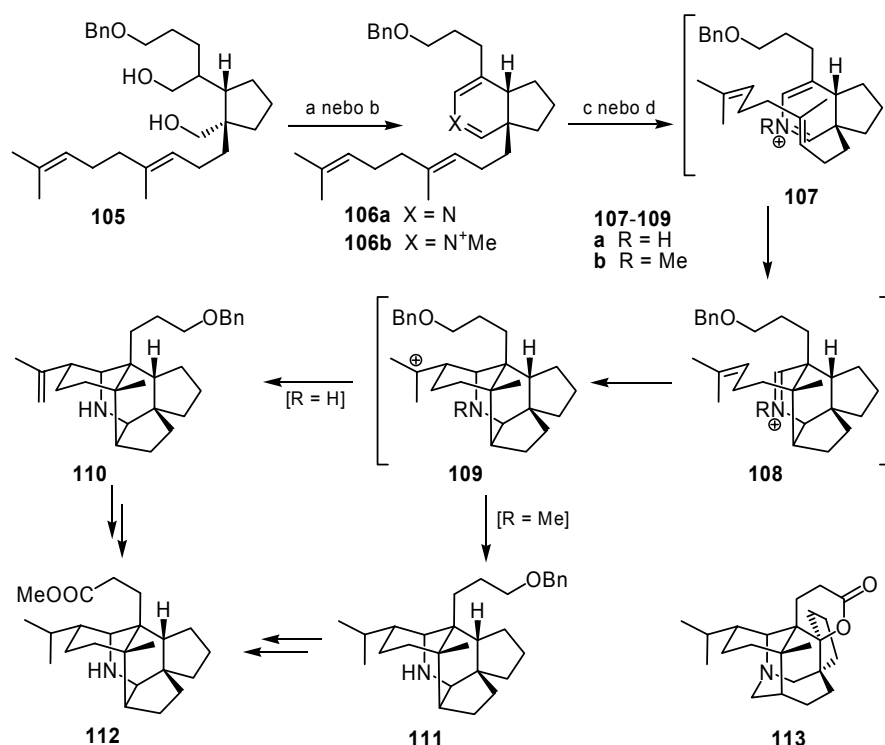


Schéma 16. **Syntéza ($\pm$)-methyl-homosekodaefnyllátu**; činidla a podmínky: a) $(\text{COCl})_2$, DMSO, CH_2Cl_2 , -78°C 15 min, potom Et_3N , -78°C 5 min $\rightarrow 0^\circ\text{C}$ 50 min, potom NH_3 (g), 0°C 10 min $\rightarrow \text{rt}$ (45 min). b) $(\text{COCl})_2$, DMSO, CH_2Cl_2 , -78°C 30 min, potom Et_3N , -78°C 5 min $\rightarrow 0^\circ\text{C}$ 1 h, potom MeNH_2 (g), 0°C $\rightarrow \text{rt}$ (1 h). c) **106a**, NH_4OAc , AcOH, rt 30 min $\rightarrow 70^\circ\text{C}$ 1,5 h (**110** 82 %). d) **106b**, NH_4OAc , AcOH, 85°C 10 h (**111** 75 %)

6. Mannichova reakce na přelomu století.

Výhled

Rozpoznání faktorů, ovlivňujících průběh pestré škály procesů založených na adici nukleofilů na dvojnou vazbu $\text{C}=\text{N}$, umožňuje cílené využívání takových procesů v efektivní konstrukci skeletů stále složitějších alkaloidů. Krásnou ilustraci můžeme nalézt ve vysoce stereo- a enantioselektivní syntéze ekteinascidinu 743 (**125**), kterou publikoval^{132,133} Corey se spolupracovníky (Schéma 17). Tento metabolit nebyl dostupný izolací v množství potřebném pro biologické studie, a jeho totální syntéza tak měla kromě prestižního i praktický důvod.

Pentacyklické jádro alkaloidu bylo vybudováno pomocí dvou *N*-acyliminiových cyklizací: Z acetalu **114** uvolněný aldehyd cyklodehydratoval za vzniku *N*-acyliminia **115**, jehož Pictetovou-Spenglerovou cyklizací ($\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$) byl získán přemostěný isochinolin **116** (73 %). Jeho interakcí s aldehydem **117** generované imi-

nium bylo zachyceno kyanidem. Izolovaný α -kyanaminolaktón **118** byl redukován na laktol. Za kyselé katalýzy (MsOH) utvořené další *N*-acyliminium **119** bylo následnou Pictetovou-Spenglerovou cyklizací (tvorba dalšího tetrahydroisochinolinu; 55 % ze **118**) a dalšími úpravami transformováno ve fenol **120**. Neméně zajímavá je následující výstavba 10-členného cyklu, která spočívá v regioselektivní oxidaci fenolu **120** a následné konverzi v hydroxyketon **121**. Pomocí Swernova činidla (není oxidace!) a bázi generovaný enon-thiolát **122** podlehl interní Michaelově adici za vzniku **123** (po acetylaci) v 79% vý-
těžku! Konverze na α -ketolaktón **124** umožnila další stereoselektivní Pictetovu-Spenglerovu kondenzaci (82 %) a nakonec transformaci v hemiaminal ekteinascidin 743 (**125**); další totální syntézy^{134,135}.

Mannichova a příbuzné reakce se vyvinuly v mohutný nástroj syntézy dusíkatých heterocyklů; je více než pravděpodobné, že tyto procesy si významné postavení v totálních syntézách nejen alkaloidů i nadále udrží.

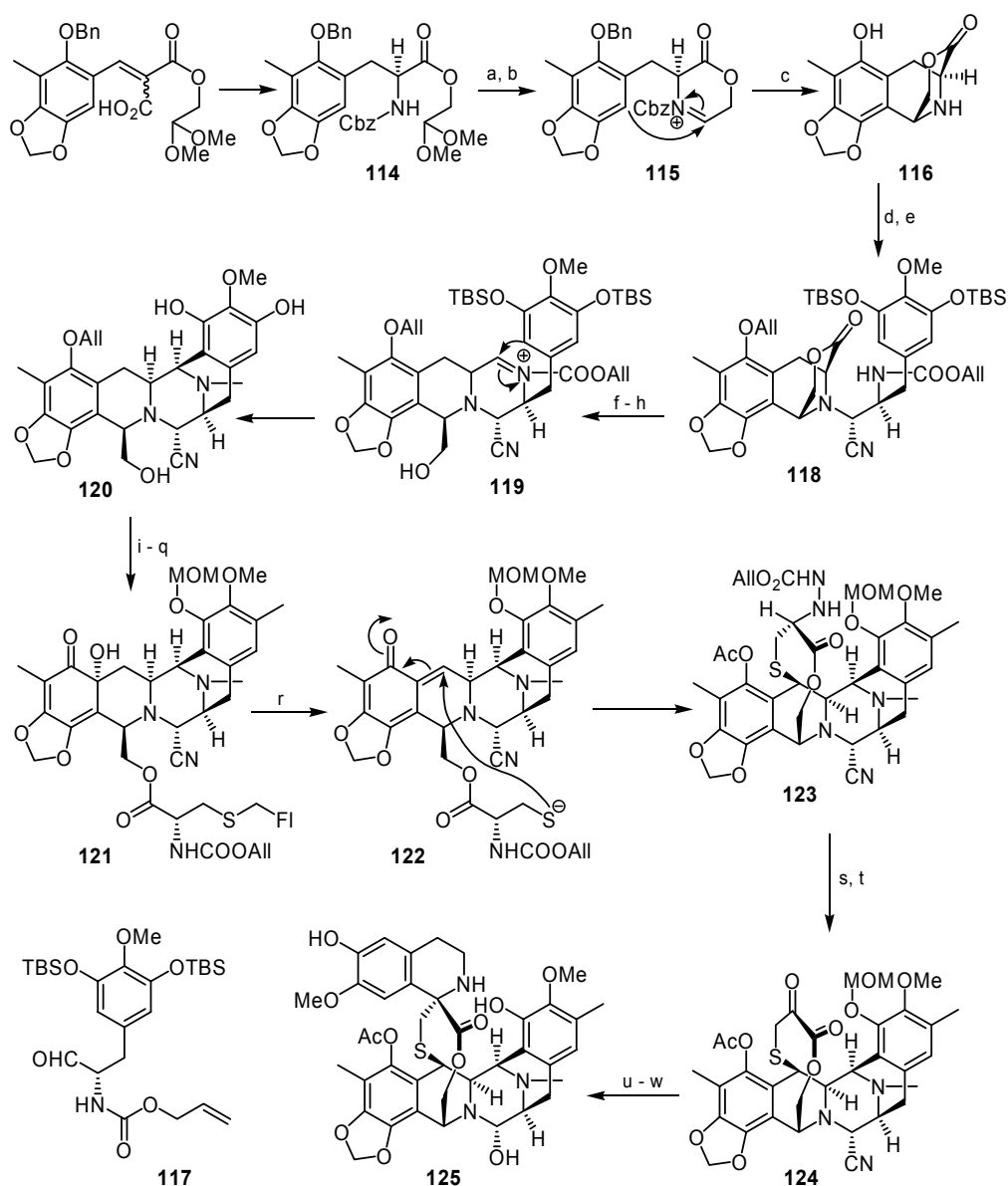


Schéma 17. **Syntéza ekteinascidinu 743**; činidla a podmínky: a) $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (10 ekv.), H_2O (10 ekv.), CH_2Cl_2 , 0 °C 10 min. b) $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (17 ekv.), 4 Å MS, CH_2Cl_2 , 23 °C 18 h (73 %). c) H_2 (1 atm), 10% Pd/C, AcOEt, 23 °C 6 h (100 %). d) **117**, KCN (25 ekv.), AcOH, 23 °C 18 h. e) $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{Br}$ (5 ekv.), Cs_2CO_3 (2 ekv.), DMF, 23 °C 1 h (87 % 2 stupně). f) Dibal-H (1,2 ekv.), PhMe, -78 °C 5 h. g) $\text{KF} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (přebytek), MeOH, 23 °C 20 min. h) MsOH (20 ekv.), 3 Å MS, CH_2Cl_2 , 23 °C 5 h (55 % ze **118**). i) TP_3N (5 ekv.), Et_3N , DMAP, CH_2Cl_2 , 23 °C 6 h (72 %). j) TBDPSCl (přebytek), DMAP, CH_2Cl_2 , 23 °C 13 h (89 %). k) MOMBBr, *i*-Pr₃NH, CH_2Cl_2 , 23 °C 20 min (92 %). l) $(\text{Ph}_3\text{P})_2\text{PdCl}_2$ (kat.), Bu_3SnH , AcOH (přebytek), CH_2Cl_2 , 23 °C 15 min (100 %). m) CH_2O (přebytek), NaBH_3CN , AcOH, MeCN, CH_2Cl_2 , 23 °C 30 min (95 %). n) $(\text{Ph}_3\text{P})_2\text{PdCl}_2$, Me_4Sn (přebytek), LiCl, DMF, 80 °C 2 h (83 %). o) $(\text{PhSeO})_2\text{O}$ (1,1 ekv.), CH_2Cl_2 , 23 °C 15 min. p) TBAF (2 ekv.), THF, 23 °C 10 min (75 % 2 stupně). q) *N*-AlloOC-*S*-*CH*-*F*-Cys-OH, EDC.HCl (5 ekv.), DMAP (5 ekv.), CH_2Cl_2 , 23 °C 30 min (91 %). r) TiF_4 , DMSO, -40 °C 30 min, potom *i*-Pr₃NH, -0 °C 30 min, potom *t*-BuOH, 0 °C, $(\text{Me}_2\text{N})_2\text{C}=\text{N}$ -Bu, 23 °C, potom Ac_2O , 23 °C (79 % celkem). s) $(\text{Ph}_3\text{P})_2\text{PdCl}_2$ (kat.), Bu_3SnH (přebytek), AcOH, CH_2Cl_2 , 23 °C 5 min (84 %). t) 4-Formyl-1-methylpyridinium jodid (20 ekv.), DBU (20 ekv.), DMF, CH_2Cl_2 , 23 °C 40 min (70 %). u) (3-Hydroxy-4-methoxyfenyl)ethylamin, silikagel, EtOH, 23 °C 10 h (82 %). v) TFA/THF/ H_2O (4:1:1), 23 °C 9 h. w) AgNO_3 (20 ekv.), MeCN/ H_2O (3:2), CH_2Cl_2 , 23 °C 11 h (77 %).

LITERATURA

- Hesse M.: *Alkaloids. Nature's Curse or Blessing*. Wiley-VCH, New York 2002.
- Nicolaou K. C., Sorensen E. J.: *Classics in Total Synthesis*. VCH, Weinheim 1996.
- Nicolaou K. C., Snyder S. A.: *Classics in Total Synthesis II*. Wiley-VCH, Weinheim 2003.
- Nicolaou K. C., Vourloumis D., Winssinger N., Baran P. S.: *Angew. Chem. Int. Ed.* **39**, 44 (2000).
- The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology*. (Manske R. H. F., ed.), díl 1. Academic Press, New York 1950.
- Studies In Natural Products Chemistry*. (Rahman A., ed.), díl 1. Elsevier, Amsterdam.
- Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives*. (Pelletier S. W., ed.), díl 1. Elsevier Science, Amsterdam.
- Nat. Prod. Rep.* **1**, 1 (1984).
- Ladenburg A.: *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **19**, 2578 (1886).
- Willstätter R.: *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **34**, 3163 (1901).
- Robinson R.: *J. Chem. Soc.* **111**, 762 (1917).
- Posner G. H.: *Chem. Rev.* **86**, 831 (1986).
- Scholz U., Winterfeldt E.: *Nat. Prod. Rep.* **17**, 349 (2000).
- de la Torre M., Sierra M. A.: *Angew. Chem. Int. Ed.* **43**, 160 (2004).
- Schöpf C.: *Angew. Chem.* **50**, 797 (1937).
- Cope A. C., Dryner H. L., Jr., Overberger C. G., D'Addieco A. A.: *J. Am. Chem. Soc.* **73**, 3416 (1951).
- Paquette L. A., Heimaster J. W.: *J. Am. Chem. Soc.* **88**, 763 (1966).
- Woodward R. B., Bader F. E., Bickel H., Frey A. J., Kierstead R.: *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 2023 (1956).
- Lounasmaa M., Berner M., Brunner M., Suomalainen H., Tolvanen A.: *Tetrahedron* **54**, 10205 (1988).
- Protiva M., Jilek J. O., Ernest I., Novák L.: *Tetrahedron Lett.* **11**, 12 (1959).
- Julian P. L., Pikl J., Boggess D.: *J. Am. Chem. Soc.* **56**, 1797 (1934).
- Witkop B.: *Heterocycles* **49**, 9 (1998).
- Gates M., Tschudi G.: *J. Am. Chem. Soc.* **74**, 1109 (1952).
- Woodward R. B., Cava M. P., Ollis W. D., Hunger A., Daeniker H. U., Schenker K.: *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 4749 (1954).
- Nicolaou K. C., Sorensen E. J.: *Classics in Total Synthesis*, kap. 8. VCH, Weinheim 1996.
- Koskinen A. M. P.: *Asymmetric Synthesis of Natural Products*. John Wiley & Sons, New York 1993.
- Nicolaou K. C., Baran P. S.: *Angew. Chem. Int. Ed.* **41**, 2678 (2002).
- Kolb H. C., Finn M. G., Sharpless K. B.: *Angew. Chem. Int. Ed.* **40**, 2005 (2001).
- Sierra M. A., de la Torre M. C.: *Angew. Chem. Int. Ed.* **39**, 1538 (2000).
- Ho T. L.: *Tandem Organic Reactions*. Wiley, New York 1992.
- Tietze L. F.: *Chem. Rev.* **96**, 115 (1996).
- Parsons P. J., Penkett C. S., Shell A. J.: *Chem. Rev.* **96**, 195 (1996).
- Nicolaou K. C., Montagnon T., Snyder A. A.: *Chem. Commun.* **2003**, 551.
- Roos G.: *Compendium of Chiral Auxiliary Applications*, díl 1–3. Academic Press, New York 2002.
- Synthesis of Natural Products: Problems of Stereoselectivity*, (Kočovský P., Tureček F., Hájíček J., eds.), díl I, kap. 8. CRC Press, Boca Raton 1986.
- Corey E. J., Cheng X.-M.: *The Logic of Chemical Synthesis*. Wiley, New York 1989.
- Royer J., Bonin M., Micoun L.: *Chem. Rev.* **104**, 2311 (2004).
- Synthesis of Natural Products: Problems of Stereoselectivity*, (Kočovský P., Tureček F., Hájíček J., eds.), díl II, kap. 1. CRC Press, Boca Raton 1986.
- Arend M., Westermann B., Risch N.: *Angew. Chem. Int. Ed.* **37**, 1045 (1998).
- Stevens R. V., Lee W. M.: *J. Am. Chem. Soc.* **101**, 7032 (1979).
- Deslongchamps P.: *Stereoelectronic Effects in Organic Chemistry*. Pergamon Press, New York 1983.
- Stevens R. V.: *Acc. Chem. Res.* **17**, 289 (1984).
- Scott W. L., Evans D. A.: *J. Am. Chem. Soc.* **94**, 4779 (1972).
- Heathcock C. H., Kleinman E. F., Binkley E. S.: *J. Am. Chem. Soc.* **100**, 8036 (1978).
- Corey E. J., Balanson R. D.: *J. Am. Chem. Soc.* **96**, 6516 (1974).
- Ryckman D. M., Stevens R. V.: *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 4940 (1987).
- Stevens R. V., Pruitt J. R.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1425** (1983).
- Winkler J. D., Axten J. M.: *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 6425 (1998).
- Magnus P., Gazzard L., Hobson L., Payne A. H., Rainey T. J., Westlund N., Lynch V.: *Tetrahedron* **58**, 3423 (2002).
- Magnus P., Gazzard L., Hobson L., Payne A. H., Lynch V.: *Tetrahedron Lett.* **40**, 5135 (1999).
- Hájíček J., Trojánek J.: *Tetrahedron Lett.* **23**, 365 (1982).
- Maupérin P., Lévy J. J.: *Tetrahedron Lett.* **1971**, 999.
- Hájíček J., Trojánek J.: *Tetrahedron Lett.* **22**, 1523 (1981).
- Hugel G., Massiot G., Lévy J., LeMen J.: *Tetrahedron* **37**, 1369 (1981).
- Palmisano G., Danieli B., Lesma G., Trupiano F., Pilati T.: *J. Org. Chem.* **53**, 1056 (1988).
- Rahman A.-u., Iqbal Z., Nasir H. v.: *Studies In Natural Products Chemistry*, (Rahman A., ed.), díl 14, str. 805. Elsevier, Amsterdam 1994.
- Yokoshima S., Ueda T., Kobayashi S., Sato A., Ku-

- boyama T., Tokuyama H., Fukuyama T.: *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 2137 (2002).
58. Kobayashi S., Ueda T., Fukuyama T.: *Synlett* 2000, 883.
59. Schneider C.: *Angew. Chem. Int. Ed.* **41**, 4217 (2002).
60. Kuehne M. E., Bornmann W. G.: *J. Org. Chem.* **56**, 513 (1991).
61. Magnus P., Mendoza J. S., Stamford A., Ladlow M., Willis P.: *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 10232 (1992).
62. Langlois N., Guéritte F., Langlois Y., Potier P.: *J. Am. Chem. Soc.* **98**, 7017 (1976).
63. Grierson D. v: *Organic Reactions*, (Paquette L. A., ed.), díl 39, str. 85. John Wiley & Sons, New York 1990.
64. Kutney J. P., Choi L. S. L., Nakano J., Tsukamoto H., McHugh M., Boulet C. A.: *Heterocycles* **27**, 1845 (1988).
65. He F., Bo Y., Altom J. D., Corey E. J.: *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 6771 (1999).
66. Sumi S., Matsumoto K., Tokuyama H., Fukuyama T.: *Org. Lett.* **5**, 1891 (2003).
67. Cox E. D., Cook J. M.: *Chem. Rev.* **95**, 1797 (1995).
68. Le Ménez P., Kunesch N., Liu S., Wenkert E.: *J. Org. Chem.* **56**, 2915 (1991).
69. Bosch J., Bennasar M.-L.: *Synlett* 1995, 587.
70. Fukuyama T., Yang L., Ajeck K. L., Sachleben R. A.: *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 3712 (1990).
71. Myers A. G., Plowright A. T.: *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 5114 (2001).
72. Lavilla R.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2002**, 1141.
73. Kuethe J. T., Comins D. L.: *Org. Lett.* **2**, 855 (2000).
74. Blumenkopf T. A., Overman L. E.: *Chem. Rev.* **86**, 857 (1986).
75. Franklin A. S., Overman L. E.: *Chem. Rev.* **96**, 505 (1996).
76. Overman L. E.: *Acc. Chem. Res.* **25**, 352 (1992).
77. Knight S. D., Overman L. E., Pairedeau G.: *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 9293 (1993).
78. Bonjoch J., Solé D.: *Chem. Rev.* **100**, 3455 (2000).
79. Santaniello E., Ferraboschi P., Grisenti P., Manzocchi A.: *Chem. Rev.* **92**, 1071 (1992).
80. Knight S. D., Overman L. E., Pairedeau G.: *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 5776 (1995).
81. Overman L. E., Sworin M., Burk R. M.: *J. Org. Chem.* **48**, 2685 (1983).
82. Angle S. R., Fevig J. M., Knight S. D., Marquis R. W., Jr., Overman L. E.: *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 3966 (1993).
83. Overman L. E., Robertson G., Robichaud A. J.: *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 2598 (1991).
84. Agami C., Cases M., Couty F.: *J. Org. Chem.* **59**, 7937 (1994).
85. Deng W., Overman L. E.: *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 11241 (1994).
86. Martin S. F.: *Acc. Chem. Rev.* **35**, 895 (2002).
87. Bur S. K., Martin S. F.: *Tetrahedron* **57**, 3221 (2001).
88. Ito M., Clark C. W., Mortimore M., Goh J. B., Martin S. F.: *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 8003 (2001).
89. Martin S. F., Clark C. W., Ito M., Mortimore M.: *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 9804 (1996).
90. Martin S. F., Barr K. J.: *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 3299 (1996).
91. Sardina F. J., Howard M. H., Morningstar M., Rapoport H.: *J. Org. Chem.* **55**, 5025 (1990).
92. Mansell H. L.: *Tetrahedron* **52**, 6025 (1996).
93. Hernandez A. S., Marcos M., Rapoport H.: *J. Org. Chem.* **60**, 2683 (1995).
94. Hernandez A. S., Thaler A., Castella J., Rapoport H.: *J. Org. Chem.* **61**, 314 (1996).
95. Christie B. D., Rapoport H.: *J. Org. Chem.* **50**, 1239 (1985).
96. Speckamp W. N., Hiemstra H.: *Tetrahedron* **41**, 4367 (1985).
97. Maryanoff B. E., Zhang H.-C., Cohen J. H., Turchi I. J., Maryanoff C. A.: *Chem. Rev.* **104**, 1431 (2004).
98. Stork G., Kretschmer R. A., Schlessinger R. A.: *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 1647 (1968).
99. Padwa A., Waterson A. G.: *Curr. Org. Chem.* **4**, 175 (2000).
100. Padwa A., Hennig R., Kappe C. O., Reger T. S.: *J. Org. Chem.* **63**, 1144 (1998).
101. Bur S. K., Padwa A.: *Chem. Rev.* **104**, 2401 (2004).
102. Kappe C. O., Murphree S. S., Padwa A.: *Tetrahedron* **53**, 14179 (1997).
103. Padwa A., Danca D.: *Org. Lett.* **4**, 715 (2002).
104. Padwa A., Brodney M. A., Dimitroff M., Liu B., Wu T.: *J. Org. Chem.* **66**, 3119 (2001).
105. Toczko M. A., Heathcock.: *J. Org. Chem.* **65**, 2642 (2000).
106. Stork G., Niu D., Fujimoto A., Koft E. R., Balkovec J. M., Tata J. R., Dake G. R.: *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 3239 (2001).
107. Gutzwiller J., Uskokovic M.: *J. Am. Chem. Soc.* **100**, 576 (1978).
108. Szántay C., Szabó L., Kalaus G.: *Tetrahedron* **33**, 1803 (1977).
109. Massiot G., Oliveira F. S., Lévy J.: *Bull. Soc. Chim. Fr. II* **1982**, 185.
110. Buzas A., Retourne C., Jacquet J. P., Lavielle G.: *Tetrahedron* **34**, 3001 (1978).
111. Stevens R. V., Lee A. W. M.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1982**, 102.
112. Stevens R. V., Lee A. W. M.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1982**, 103.
113. Royer J., Husson H.-P.: *Janssen Chim. Acta* **11** (No. 28), 3 (1993).
114. Gauthier I., Royer J., Husson H.-P.: *J. Org. Chem.* **62**, 6704 (1997).
115. Yue C., Royer J., Husson H.-P.: *J. Org. Chem.* **57**, 4211 (1992).
116. François D., Lallemand M.-C., Selkti M., Tomas A., Kunesch N., Husson H.-P.: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **37**, 104 (1998).
117. Yue C., Royer J., Husson H.-P.: *J. Org. Chem.* **55**,

- 1140 (1990).
118. Amat M., Llor N., Hidalgo J., Escolano C., Bosch J.: *J. Org. Chem.* **68**, 1919 (2003).
119. Allin S. M., James S. L., Elsegood M. R. J., Martin W. P.: *J. Org. Chem.* **67**, 9464 (2002).
120. Hubbs J. L., Heathcock C. H.: *Org. Lett.* **1**, 1315 (1999).
121. Heathcock C. H., Norman M. H., Dickman D. A.: *J. Org. Chem.* **55**, 798 (1990).
122. Kawahara M., Nishida A., Nakagawa M.: *Org. Lett.* **2**, 675 (2000).
123. Tanner D.: *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **33**, 599 (1994).
124. Nakagawa M., Kawahara M.: *Org. Lett.* **2**, 953 (2000).
125. Heathcock C. H., Piettre S., Ruggeri R. B., Ragan J. A., Kath J. C.: *J. Org. Chem.* **57**, 2554 (1992).
126. Wallace G. A., Heathcock C. H.: *J. Org. Chem.* **66**, 450 (2001).
127. Heathcock C. H., Hansen M. M., Ruggeri R. B., Kath J. C.: *J. Org. Chem.* **57**, 2544 (1992).
128. Heathcock C. H., Stafford J. A.: *J. Org. Chem.* **57**, 2566 (1992).
129. Heathcock C. H., Ruggeri R. B., McClure K. F.: *J. Org. Chem.* **57**, 2585 (1992).
130. Heathcock C. H., Stafford J. A., Clark D. L.: *J. Org. Chem.* **57**, 2575 (1992).
131. Heathcock C. L.: *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **31**, 665 (1992).
132. Corey E. J., Gin D. Y., Kania R. S.: *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 9202 (1996).
133. Martinez E. J., Corey E. J.: *Org. Lett.* **2**, 993 (2000).
134. Endo A., Yanagisawa A., Abe M., Tohma S., Kan T., Fukuyama T.: *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 6552 (2002).
135. Menchaca R., Martínez V., Rodríguez A., Rodríguez N., Flores M., Gallego P., Manzanares I., Cuevas C.: *J. Org. Chem.* **68**, 8859 (2003).

J. Hájíček (*Zentiva – Research Institute of Pharmacy and Biochemistry, Prague*): **Mannich and Related Reactions in Total Synthesis of Alkaloids**

The review concentrates on various transformations of the C=N double bond as principal methods of total synthesis of alkaloids. Selected examples of Mannich reaction and related processes illustrate the development as well as present state of the art of synthesis of alkaloids.

OPRAVA

Redakce uveřejňuje opravu schématu v referátu Josefa Hájíčka: Mannichova a příbuzné reakce v totální syntéze alkaloidů (Chem. Listy 98, 1096 (2004)).

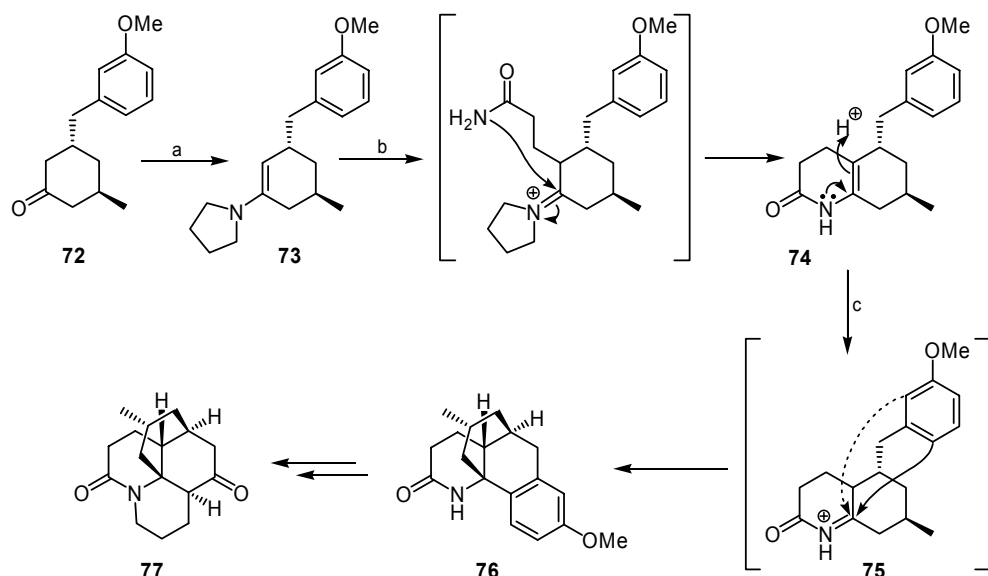


Schéma 12. **Syntéza (+/-)-lykpodinu**; činidla a podmínky: a) pyrrolidin. b) CH₂=CHCONH₂, dioxan, rf1 přes noc, potom H₂O, rf1 2 h (74 20–25 % + isomer). c) 80% H₃PO₄/HCOOH (1:1), rt 20 h (76 55 % + isomer 29 %).

CHEMIE MUŽSKÉ SEXUALITY

KATEŘINA VALENTOVÁ^a, PAVLA
ENTNEROVÁ^b, JAROSLAVA URBANÍKOVÁ^c
a VILÍM ŠIMÁNEK^a

^aÚstav lékařské chemie a biochemie, Univerzita Palackého v Olomouci, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc, ^bPsychiatrická klinika FN Olomouc, I. P. Pavlova 22, 775 00 Olomouc, ^cFakultní lékárna, FN Olomouc, I. P. Pavlova 22, 775 00 Olomouc
kata.valentova@email.cz

Došlo 2.11.04, přijato 21.11.04.

Klíčová slova: erektilní dysfunkce, terapie, léky, fytopřípravky, doplňky stravy, mechanismus účinku, vedlejší účinky

Obsah

1. Úvod
2. Léky v terapii erektilní dysfunkce
 - 2.1. Inhibitory fosfodiesteras
 - 2.2. Látky s jiným mechanismem účinku
3. Fytopřípravky a doplňky stravy stimulující sexuální funkci
4. Látky s výraznými toxickými účinky stimulující erekci
5. Lékové interakce a zdravotní kontraindikace v terapii erektilní dysfunkce
6. Závěr

1. Úvod

Používání přírodních přípravků pro zvýšení pohlavní touhy a výkonnosti je staré téměř jako lidstvo samo. Jsou to převážně různé rostliny (více než 100 druhů), orgány živočichů a některé druhy hmyzu, ale také látky nerostného původu¹. Podle „bohyně smyslné lásky“ Afrodité se nazývají afrodiziaka. U většiny z nich není jejich účinnost prokázána, u některých jde spíše o účinky na libido než o účinek vyvolávající erekci. V současné době, kdy se pro řadu mužů sexuální výkonnost stala synonymem společenské úspěšnosti, asi polovina mužské populace ve věku 35 až 65 let přiznává problémy s erekcí². Erektilní dysfunkce (ED), dříve traumaticky nazývaná impotence, je definována jako trvalá neschopnost dosáhnout nebo udržet erekci penisu dostatečnou pro uspokojivou sexuální aktivitu (obr. 1). ED trpí nejméně jeden muž z deseti. Nepostihuje jen sexualitu, ale jsou s ní také spojeny záporné emoce jako nejistota, stres a problémy v partnerském životě³. V

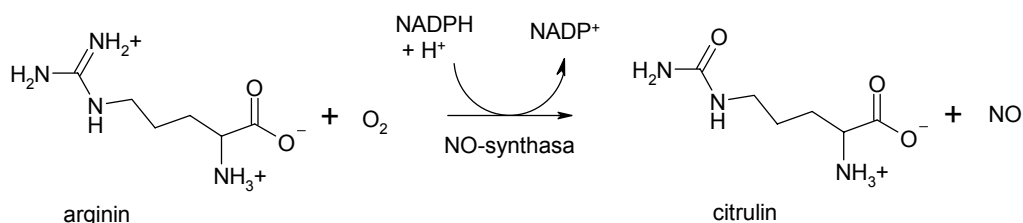
mladším věku převažují spíše psychické příčiny ED. Stále platí, že nejdůležitějším orgánem pro erekci je limbický systém v mozku. Erekci potlačuje neurotický mechanismus vznikající z úzkosti, strachu z neúspěchu, psychického a fyzického vyčerpání. Zjednodušeně lze říci, že vše, co poškozuje zdraví, poškozuje také mužství, jako např. obezita, nedostatečná či jednostranná dieta, stres, kouření, alkohol, drogy, anabolika, ale také některé léky. Ve středním a starším věku je ED nejčastěji způsobena špatným stavem cév, které neumožňují dostatečné prokrvení penisu nebo poklesem hladiny mužských pohlavních hormonů (Partial Androgen Deficiency of Aging Male, PADAM) (cit.⁴). Častou příčinou ED je benigní hyperplazie nebo karcinom prostaty, radikální prostatektomie a diabetes mellitus⁵. Není proto překvapivé, že po objevu látek účinných při ED se lék Viagra® a další erektilika staly žádanými přípravky v zemích všech kontinentů^{6,7} (viz článek S. Rádl, kap. 2, v tomto čísle).

Hladké svaly penisu jsou obvykle udržovány v semikontraktilním stavu. Hlavním mediátorem relaxace hladkých svalových vláken penisu – erekce, je oxid dusnatý, jehož prekurzorem je L-arginin (obr. 2) (cit.²). Při vzrušení je NO, po nonadrenergní noncholinergní nervové stimulaci, uvolňován z endotelových buněk (obr. 3). V hladkém svalovém vlákně kavernózního tělesa (*corpora cavernosa*) aktivuje cytosolovou guanylátcyklasu (EC 4.6.1.2., GC) k produkci cyklického guanosin-3',5'-monofosfátu (cGMP). Cyklický GMP aktivuje specifickou proteinkinasu, která fosforyluje specifické proteiny a iontové kanály. Tyto kanály se otvírají pro draselné ionty, buněčné membrány se hyperpolarizují, a tím se zablokuje příjem vápenatých iontů buňkou. Následkem je pokles koncentrace Ca²⁺ v cytosolu a relaxace hladkého svalstva arterií a arteriol erektilní tkáně, což vede k několikanásobnému zvýšení přítoku krve do penisu. Současně relaxace trabe-

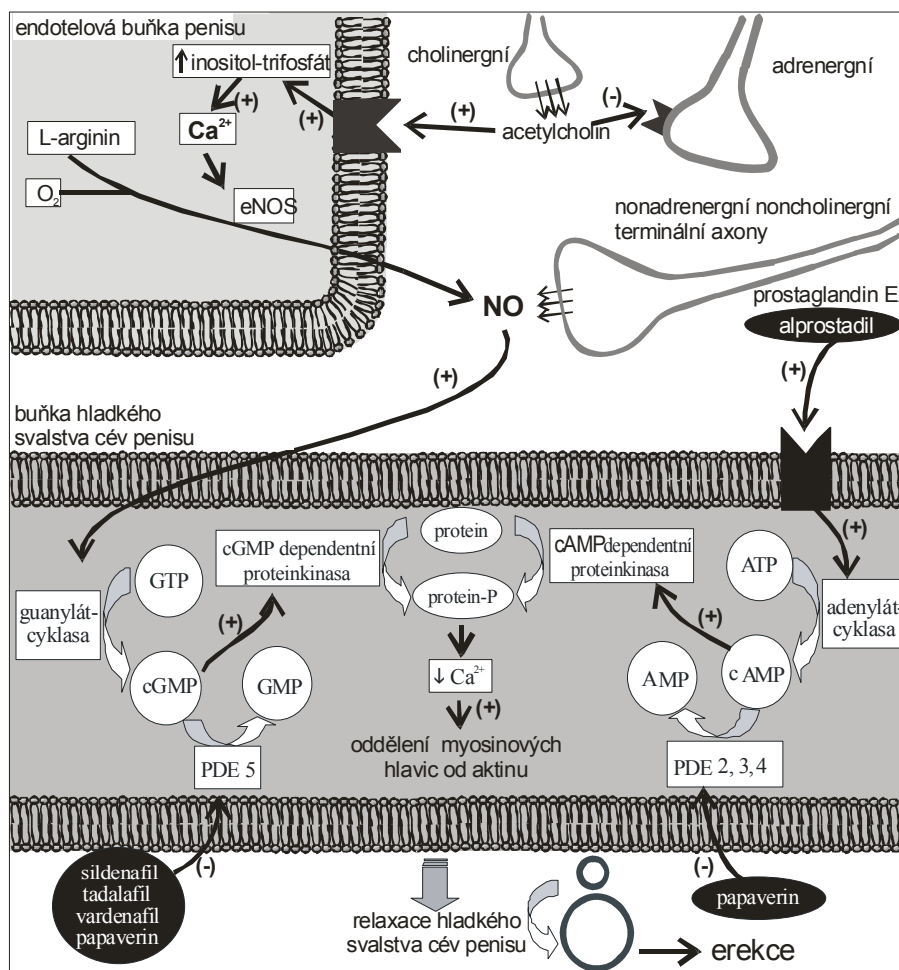


VÁŠ JEŠTĚ SOULOŽÍ? MŮŽE UŽ JENOM PUBLIKOVAT. . .

Obr. 1.



Obr. 2. Biosyntéza oxidu dusnatého



Obr. 3. Relaxace buňky hladkého svalstva cév penisu a mechanismus působení některých látek s erektilním účinkem; (-) – inhibice, (+) – aktivace, eNOS – endotelová NO-synthasa, PDE – fosfodiesterasa

kul hladkých svalových vláken vede k rychlému naplnění lakunárních prostor kavernózních těles krví a jejich expanzi. Subtunikální žilní pletence jsou stlačeny a odtok krve je prakticky úplně zamezen. Tyto děje zadržují krev v kavernózních tělesech, kde je možné během masturbace či pohlavního styku dosáhnout tlaku až několik stovek mm Hg. Přechodně se zastaví výměna krve mezi penisem a ostatními částmi organismu. Během návratu penisu do ochablého stavu je cGMP hydrolyzován fosfodiesterasou

typu 5 (EC 3.1.4.17, PDE 5). Signální molekulou, která rovněž zprostředkovává relaxaci, je prostaglandin E_1 (PGE_1). Ten aktivuje produkci cyklického adenosin-3',5'-monofosfátu (cAMP), který je hydrolyzován enzymy PDE 2-4 (obr. 3) (cit.²).

Doporučení pro diagnózu a léčbu ED byla přijata v roce 2001 (cit.⁸). Mnoho pacientů však nadále upřednostňuje přírodní alternativy erektilik. V minulých letech nebyvale vzrostl prodej fytopřípravků a doplňků stravy

s udávaným erektilním účinkem⁹. Tento článek je přehledem dosavadních poznatků o látkách a rostlinách, které jsou aktivními složkami léků, fytopřípravků a doplňků stravy používaných resp. doporučovaných mužům s poruchami erekce. Předmětem článku nejsou přírodní afrodiziaka a drogy s neprokázaným účinkem na ED. Článek rovněž neobsahuje žádná doporučení k výběru přípravku.

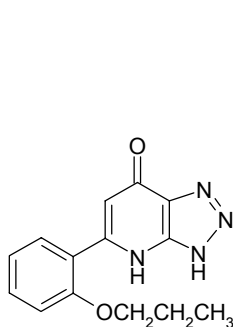
2. Léky v terapii erektilní dysfunkce

2.1. Inhibitory fosfodiesteras

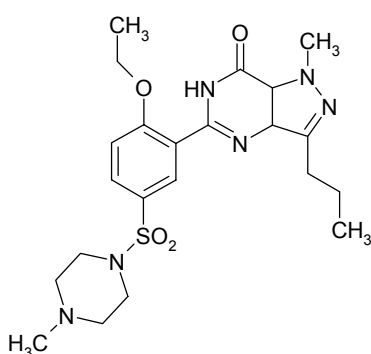
Historie inhibitorů fosfodiesteras pro léčbu ED se datuje od roku 1986 (cit.¹⁰). Začala vývojem antihypertenziva, které by pozitivně ovlivňovalo vasodilatační a diuretický účinek endogenního atrálního natriuretického peptidu (ANP). ANP receptor aktivuje v ledvinách tvorbu GC, což vede ke zvýšení hladiny cGMP, snížení hladiny volného intracelulárního vápníku, zlepšení prokrvení ledvin, a tím ke zvýšenému vylučování sodíku a současnému po-

klesu krevního tlaku. Výzkumný tým firmy Pfizer se zaměřil na inhibitory PDE-enzymů, které regulují hladinu cGMP v buňce; výchozí modelovou strukturou byla sloučenina nazvaná zaprinast (obr. 4). V roce 1989 byla z několika perspektivních inhibitorů PDE 5 vybrána látka, která dostala generický název sildenafil. Poslední literární přehled inhibitorů fosfodiesteras cyklických nukleotidů byl publikován v roce 2004 (cit.¹¹), struktury některých z nich a hodnoty IC_{50} jsou uvedeny na obr. 4.

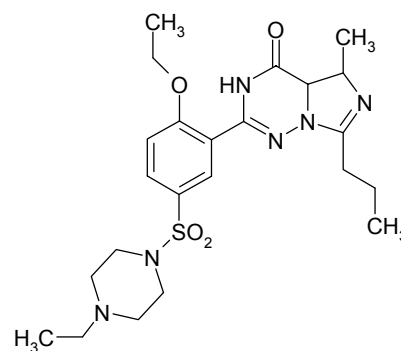
Sildenafil (viz obr. 4). V tenkém střevě a játrech je sildenafil metabolizován formou cytochromu P450, CYP3A4, na *N*-desmethylsildenafil a jeho absolutní biologická dostupnost je kolem 40 %. Jako lék pro terapii ED byl sildenafil (Viagra®) schválen v roce 1998 (cit.¹²). Obvyklá doporučená dávka sildenafilu je 50 mg, maximálně 100 mg denně. Někteří pacienti uvádějí dobrý efekt i po dávkách 25 mg a méně. Účinek se dostavuje lépe při užití nalačno, lék lze kombinovat s malým množstvím alkoholických nápojů. Účinek nastupuje do 30 až 60 min a trvá 4 h. Lék je účinný pouze v reakci na sexuální stimulaci. K nejčastějším nežádoucím efektům patří návaly horka,



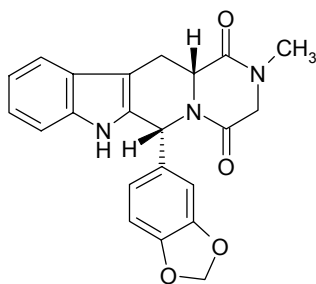
zaprinast (0,76)



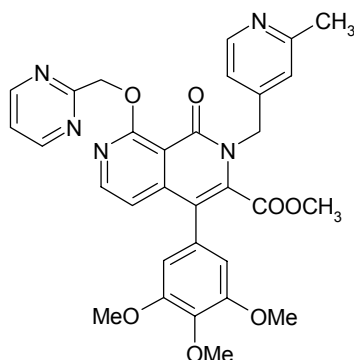
sildenafil (0,004)



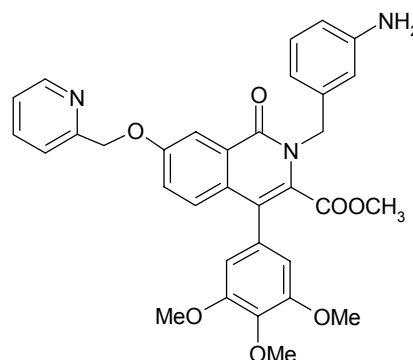
varafenafil (0,0007)



tadalafil (0,005)



T-0156 (0,0002)



T-1032 (0,001)

Obr. 4. **Struktury některých inhibitorů fosfodiesterasy PDE 5.** Hodnoty IC_{50} v $\mu\text{mol.l}^{-1}$ jsou uvedeny v závorce za názvem sloučeniny, chemické názvy sildenafilu, vardenafilu a tadalafilu jsou: 5-[2-ethoxy-5-(4-methylpiperazin-1-sulfonyl)]-1-methyl-3-propyl-3a,7a-dihydro-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-7(6H)-on, 2-[2-ethoxy-5-(4-ethylpiperazin-1-sulfonyl)]-5-methyl-7-propyl-4a,5-dihydroimidazo[5,1-f][1,2,4]triazin-4(3H)-on a 6-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2-methyl-12,12a-dihydro-6H,7H-pyrazino[1',2':1,6]pyrido[3,4-b]indol-1,4-(2H,3H)-dion

bolesti hlavy, závratě, dyspepsie, zduření nosní sliznice, změny barevného vidění, zvýšená citlivost na světlo a rozostřené vidění^{13–15}. Pacienti uvádějí většinou výborný účinek a dobrou snášenlivost sildenafilu. Relativní nevýhodou sildenafilu je jeho rychlé vylučování z organismu a také poměrně vysoký inhibiční účinek na aktivitu PDE 6, enzymu lokalizovaného na tyčinkách a čípcích sítnice oka (má 10× menší afinitu než k PDE 5). Následkem inhibice PDE 6 jsou změny barevného vidění. Z těchto důvodů jsou hledány látky s větší selektivitou k PDE 5 (cit.¹⁶).

Vardenafil (viz obr. 4). Vardenafil (Levitra®) se od sildenafilu liší záměnou skeletu pyrazolopyrimidinu za imidazolotriazin a methylové skupiny za ethylovou na N₆ piperazinu. Lék je hodnocen jako nejúčinnější a nejselektivnější inhibitor PDE 5 s rychlým nástupem, 10 až 30 min po podání a menším výskytem nežádoucích účinků. Jeho biologický poločas je 4 až 5 h a afinita k PDE 6 je 15× menší než k PDE 5 (cit.⁶). Podle některých klinických studií vykazal vardenafil statisticky významné zlepšení erektilní funkce u více než 60 % pacientů nereagujících na sildenafil¹⁷, byl účinný u 72 % pacientů s diabetes mellitus a 71 % mužů po prostatektomii¹⁸. Na trhu jsou tablety obsahující 5, 10 a 20 mg účinné látky. Pro dosažení erekce je nutná sexuální stimulace. Vardenafil nevykazuje žádné interakce s malým množstvím alkoholu. Nejčastějšími nežádoucími účinky, které se objevují u 10 % pacientů, byly návaly horka a bolesti hlavy, časté byly dyspepsie, nevolnost, závratě a rýma (1–10 %). Vzácněji se vyskytovalo zvýšení krevního tlaku, fotosenzitivita, poruchy vidění (0,1–1 %) a hypertonie, hypotenze a synkopa (0,01–0,1 %) (cit.^{19,20}). Stejně zkušenosti byly získány ze sexuologické poradny Fakultní nemocnice v Olomouci.

Tadalafil (viz obr. 4). Tadalafil (Cialis®) je zatím posledním schváleným inhibitorem PDE 5 a základním skeletem se liší od sildenafilu a vardenafilu (obrázky 4). Poločas tadalafilu je 17,5 h a afinita k PDE 6 je více než 700× menší než k PDE 5 (cit.⁶). Nebyl u něj popsán žádný účinek na vidění. Na trhu jsou tablety obsahující 10 mg a 20 mg účinné látky. Výsledky klinických studií ukázaly, že ještě 36 h po podání 20 mg tadalafilu bylo 79 % pokusů o koitus úspěšných; k dosažení erekce je nutná sexuální stimulace. Nástup účinku je dostatečně rychlý. Více než polovina mužů po podání 20 mg tadalafilu dosahuje erekce během 30 min, účinek není příliš ovlivněn předchozím příjmem potravy a alkoholických nápojů. K nejčastějším vedlejším účinkům patří bolest hlavy (13 %), dyspepsie (10 %), bolesti zad (6 %) a svalů (5 %) a návaly horka (4 %). V naší poradně pacienti oceňovali rychlý nástup erekce neovlivněný dietou a prodloužený účinek tadalafilu. Někteří však uváděli méně spolehlivý nástup erekce ve srovnání se sildenafilem.

Mezi dosud klinicky nezkoušené, *in vitro* účinné specifické inhibitory PDE 5 patří 2,7-naftthyridinový derivát T-0156 (obrázky 4) (cit.²¹) a 4-aryl-1-isochinolonový derivát T-1032 (obrázky 4) (cit.²²). Obě sloučeniny měly na izolované kavernózní těleso králíka relaxační účinek srovnatelný se sildenafilem.

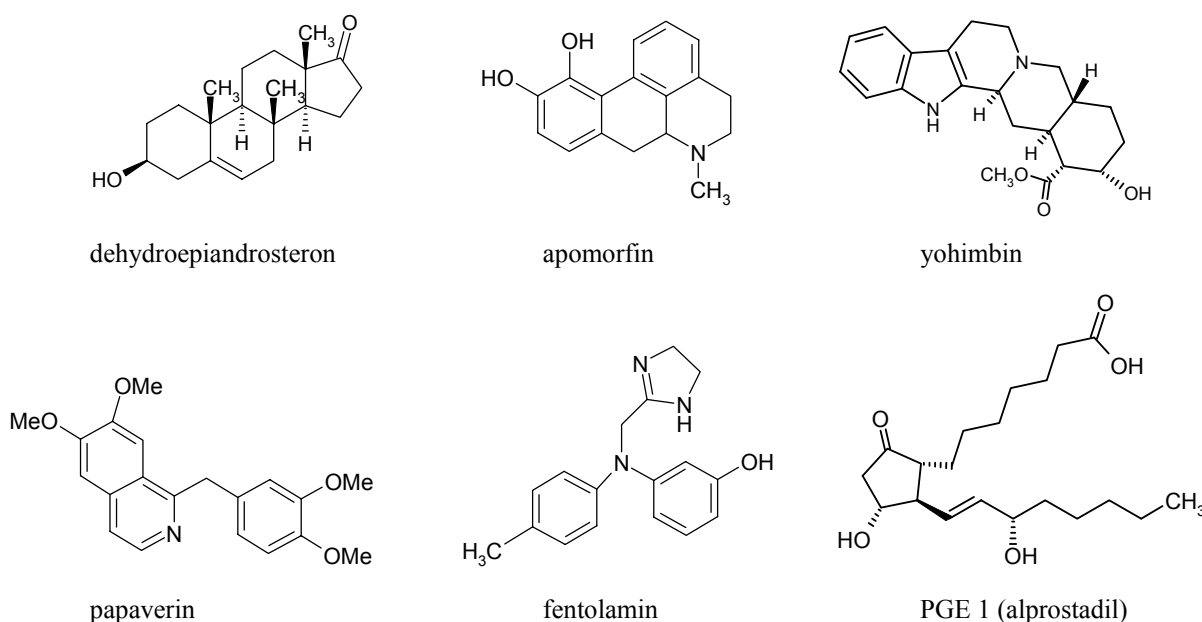
2.2. Látky s jiným mechanismem účinku

Apomorfin, yohimbin a dehydroepiandrosteron (DHEA) (obrázky 5) jsou v éře inhibitorů PDE 5 používány v terapii ED méně častěji. U apomorfinu a yohimbinu je důvodem jejich malá účinnost, u DHEA jsou stále nedostatečné znalosti o jeho celkovém působení, zejména je-li aplikován u mužů v podstatě zdravých. Papaverin, fentolamin, prostaglandin E₁ (obrázky 5) a vazodilatorní intestinální polypeptidy jsou aplikovány v terapii ED, pokud jsou kontraindikována nebo jsou neúčinná orální erektilika.

Apomorfin. ((6aR)-6-Methyl-5,6,6a,7-tetrahydro-4H-dibenzo[de,g]chinolin-10,11-diol, viz obr. 5). Apomorfin je syntetický opiat připravovaný z morfinu, sexuální funkce ovlivňuje svým účinkem na dopaminergní systém centrálního nervového systému. Váže se na dopaminové receptory D₁ a D₂ a stimuluje strukturu hypotalamu v oblasti nucleus paraventricularis se zvyšuje intenzita nervových impulzů s následným vzestupem syntézy NO, což vede k vyšší tvorbě cGMP. Apomorfin (Uprima®) je dostupný ve formě sublingválních tablet v dávkách 2 nebo 3 mg. Lék vyžaduje sexuální stimulaci. Efekt se dostavuje přibližně za 20 min a trvá 2 h. Při překročení jeho optimální dávky se asi u 20 % pacientů objevují nevolnost a zvracení. Nežádoucími účinky mohou být bolesti hlavy a závratě. Léčba nitráty není kontraindikací. Výhodou by měla být bezpečnost preparátu a 54 % efektivita erekcí dostačujících ke styku^{23,24}. Nedoporučuje se požívání alkoholických nápojů. Je paradoxem, že v letech 1987–2003 bylo publikováno nejméně 19 klinických studií potvrzujících účinnost apomorfinu v terapii ED (cit.²⁵), ale praktické zkušenosti a srovnávací klinické studie s inhibitory PDE 5 prokázaly jeho slabý erektilní účinek^{26–28}.

Yohimbin (viz obr. 5). Indolový alkaloid, izolovaný v roce 1896 Spieglem z kůry západoafrického stromu bujárníku johimbé (*Corynanthe yohimbe*, Rubiaceae), je selektivním α_2 -adrenolytikem. Presynaptickou blokádu zvyšuje hladinu katecholaminů (dopaminu, noradrenalinu) v mozku, ovlivňuje hladinu serotoninu a má antidepresivní účinek. Uvádí se, že yohimbin může zlepšovat nebo stimlovat sexuální funkce, ale tento účinek není u lidí, pro výrazné interindividuální rozdíly, spolehlivě prokázán^{9,28}. Perorálně lze podávat dávky 10–50 mg.den⁻¹ rozdělené do 2 nebo 3 dávek. Někdy dostačuje nárazové podání v dávce 5–20 mg jednu hodinu před stykem. K nejčastějším vedlejším účinkům patří návaly horka, pocení, vzrušivost, poruchy usínání, závratě, nevolnost a třes rukou^{29,30}. Na trhu je lék obsahující pouze yohimbin (Yohimbin Spiegel®) (cit.³¹). Yohimbin hydrochlorid lze předepsat též magistraliter, event. v kombinaci s kofeinem, papaverinem, strychninem nebo diazepamem.

Dehydroepiandrosteron (viz obr. 5). Hormon produkováný v kůře nadledvinek cirkuluje ve vnitřním oběhu v konjugované formě jako DHEA-sulfát. Je to jediný hormon, jehož hladina v krvi klesá lineárně s biologickým věkem. Může být metabolizován jak na testosteron, tak na estradiol. V řadě zemí, s výjimkou České republiky, se prodává jako doplněk stravy s udávaným pozitivním účin-



Obr. 5. Přírodní látky a jejich analoga s erektilním účinkem

kem na celkový fyzický a mentální stav organismu, k prevenci nebo zmírnění průběhu většiny chronických onemocnění včetně ED (cit.³²). V jedné z mála klinických studií zaměřených na ED je popisován statisticky významný účinek na erekci u pacientů, kterým byl podáván DHEA v denní dávce 50 mg po dobu 24 týdnů³³.

Papaverin (viz obr. 5). Benzylisochinolinový alkaloid, izolovaný z latexu *Papaver somniferum* (mák setý, Papaveraceae), je nespecifickým inhibitorem fosfodiesteras (PDE 2-4). Papaverin zvyšuje hladinu cAMP, má vazodilatační a spasmolytické účinky. U ED je papaverin účinný pouze, pokud je aplikován injekční formou intrakavernózně většinou v kombinaci s fentolaminem a prostagladinem E₁ (cit.³⁴). Při předávkování hrozí riziko priapismu, t.j. dlouhotrvající bolestivé erekce, která po ejakulaci nemizí, a fibrosa kavernózních těles².

Fentolamin (viz obr. 5). Imidazolinový derivát, který kompetitivně blokuje α_1 - a α_2 -adrenergní receptory a rovněž inhibuje účinky serotoninu. U ED je používán v kombinaci s papaverinem a prostagladinem E₁ (cit.^{2,34}).

Prostagladin E₁ (viz obr. 5). (PGE₁, alprostadil). PGE₁ stimuluje G-proteinový receptor aktivující adenylát-cyklasu v kavernózním tělese. Zvýšená hladina cAMP vede k relaxaci sinusoid kavernózních těles a erekci². K navození erekce je PGE₁ aplikován intrakavernózně nebo intrauretrálně (do 10 μ g), často v kombinaci s papaverinem a fentolaminem. U vaskulogenně podmíněné ED se pohybuje aplikovaná dávka do 25 μ g. V praxi bývají hlavní indikací intrakavernózní nebo intrauretrální aplikace koktejlu vazoaktivních látek neurogenně podmíněné poruchy erekce, např. ED u diabetické neuropatie nebo podmíněné mišní lézí a nereagujících na jinou léčbu.

Na trhu jsou injekční formy PGE₁ Caverject® a Karon® a pelety pro intrauretrální podání (přípravek MUSE® není v ČR prozatím schválen). Přesto, že nebezpečí nežádoucích vedlejších účinků (návaly horka, bolestivost v místě vpichu, priapismus a fibrosa), je ve srovnání s papaverinem menší, lékař zpravidla vyžaduje písemný informovaný souhlas pacienta s léčbou.

Vazoaktivní intestinální polypeptidy. Směs polypeptidů izolovaná z tkáně tenkého střeva, mající výrazný relaxační účinek na hladké svalstvo penisu, byla aplikována v kombinaci s fentolaminem³⁵. U 70 % probandů vyvolala pevnou erekci. Přípravek je aplikován (pouze v USA) intrakavernózně a jeho vedlejší účinky jsou podobné jako u předchozích injekčně podávaných léků.

3. Fytopřípravky a doplňky stravy stimulující sexuální funkci

Tato část článku je věnována složkám fytopřípravků a doplňků stravy, u kterých je udáván pozitivní vliv na erekci. Byly vybrány ty rostliny a komponenty, u kterých se vycházelo při formulaci přípravku z výsledků studia jejich biologické aktivity *in vitro*, experimentů na zvířatech a dvojité slepých, placebem kontrolovaných klinických studií na dobrovolnících. Jde většinou o intaktní části rostlin, jejich extrakty a chemicky definované přírodní látky. Nicméně, erektilní účinek přípravku je často zdůvodňován poznatky z etnofarmakologických studií^{9,36}.

Aspidosperma quebracho-blanco (kebračo, Apocynaceae). Stále zelený strom rostoucí v Jižní Americe. Biologicky aktivními látkami jsou pravděpodobně indolové alkaloidy aspidospermanového

typu. Z odhadovaného počtu asi 50 derivátů bylo strukturně charakterizováno 6 alkaloidů, např. aspidospermin a quebrachin^{37,38}. Yohimbin, jak je v literatuře často nesprávně uváděno, v rostlině nebyl nalezen. V tradiční medicíně se extrakt z kůry *A. quebracho-blanco* používá jako tonikum u onemocnění malých dýchacích cest, průduškového astmatu, emfyzému a ke zlepšení erekce³⁹. Extrakt je jednou z aktivních složek kombinovaného přípravku Afrodor 2000®, který obsahuje ještě sedativum acekarbamol a vitamin E. Klinická studie tohoto přípravku uvádí zlepšení erekce u 14 % a zvýšení libida u 15 % pacientů po 4 týdenním užívání⁴⁰. Při předávkování byly jako nežádoucí účinky zaznamenány ztrnulost, závratě, nevolnost, křeče a bolesti hlavy. Sexuologové přípravek Afrodor 2000® hodnotí příznivě⁴¹.

Corynanthe yohimbe (s. *Pausinystalia yohimbe*, bujarník yohimbé, Rubiaceae). Strom yohimbé roste v západoafrických deštních pralesích. Kůra yohimbé obsahuje jako hlavní alkaloid yohimbin (obr. 5), z dalších to jsou např. isomery yohimbinu – korynthin, *pseudo-yohimbin* a heteroyohimbanu, např. ajmalicin a korynanthein⁴². V tradiční medicíně je extrakt z kůry používán především k léčbě nedostatečné erekce³⁹. Účinek doplňků stravy, které obsahují extrakt z kůry bujarníku, na erekci je individuální a ještě obtížněji hodnotitelný než u yohimbinu.

Epimedium sagittatum (škornice, Berberidaceae). Z patnácti druhů rodu *Epimedium* je *E. sagittatum* fytochemicky nejlépe charakterizovanou rostlinou. V čínské tradiční medicíně je *herba Epimedii* aktivní složkou fytopřípravků doporučených ke zlepšení erekce. Nadzemní část *E. sagittatum* obsahuje prenylované flavonolglykosidy, z nichž byl farmakologicky podrobněji studován pouze ikariin (obr. 6) (cit.^{43–45}). Tento flavonoid je specifickým inhibitorem PDE 5 (IC_{50} 0,43 $\mu\text{mol.l}^{-1}$) s malým účinkem na PDE 4 (73,5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$) (cit.⁴⁶). Literární údaje podporují uváděnou erektilní účinnost fytopřípravků obsahujících tuto drogu.

Eriosema kraussianum (Papilionaceae). Zakrslá keřovitá rostlina používaná v tradiční medicíně kmene Kwa-Zulu (jižní Afrika) ke zvýšení mužské potence⁴⁷. Pyranosoflavony nazvané kraussianony, izolované z kořenů byly aktivní v testu relaxace kavernózního tělesa králíka. Kraussianon 1 (obr. 6) vykázal v experimentu 85 % účinnosti sildenafilu⁴⁸. Ve fytopřípravcích prodáváných na evropském trhu se tato rostlina nevyskytuje.

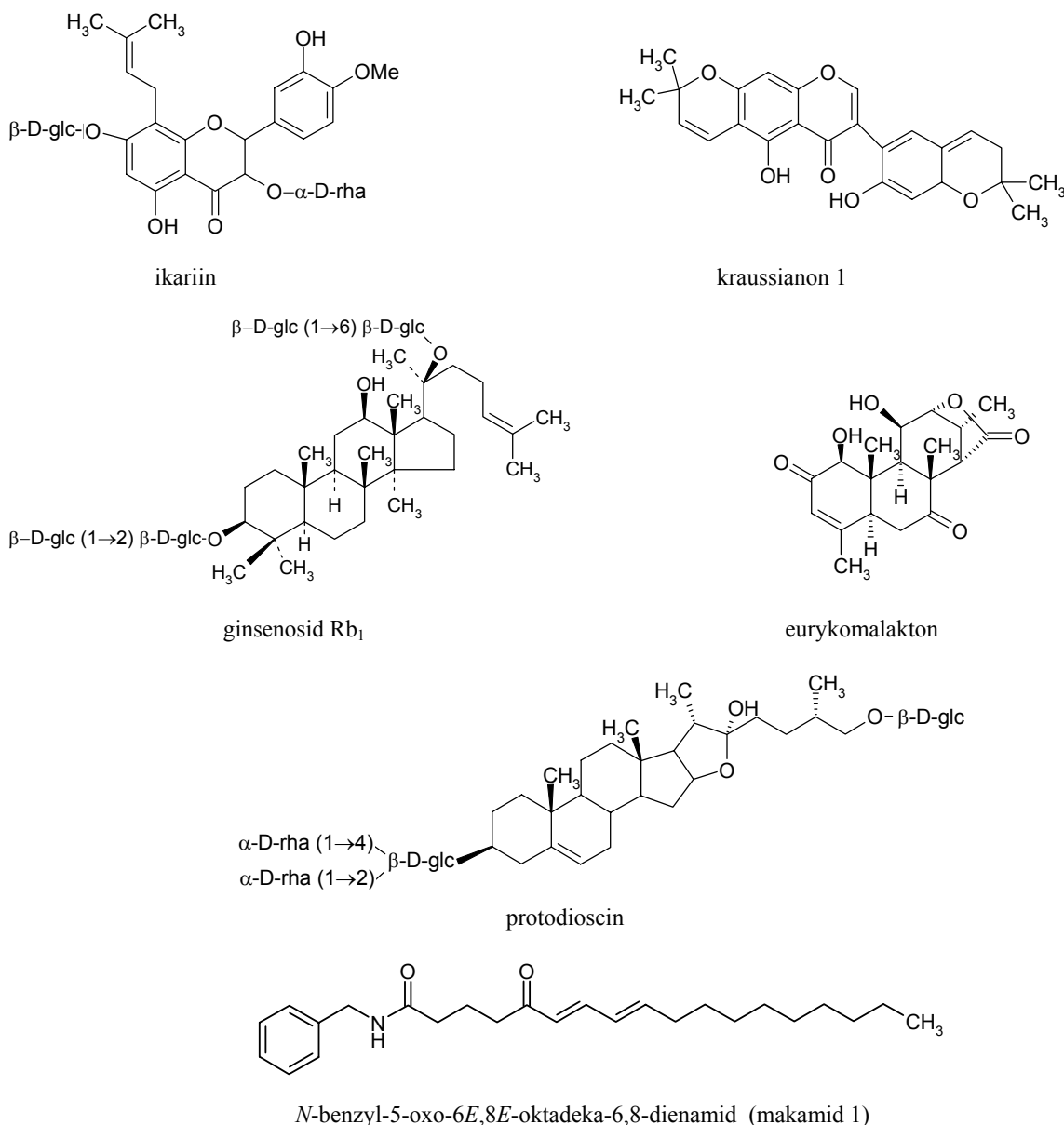
Eurycoma longifolia (Tongkat Ali, Simaroubaceae). Kořeny stromu rostoucího v deštných pralesích jihovýchodní Asie obsahují sloučeniny různých strukturních typů. Byly izolovány quassinoidy, např. eurykomalakton (obr. 6), kathin-6-onové a β -karbolinové alkaloidy, deriváty skvalenu a neolignany^{49,50}. V tradiční medicíně je extrakt *E. longifolia* používán hlavně u průjemových onemocnění, při malárii, gastritidách, horečnatých stavech a nedostatečné sexuální aktivitě. V experimentech na zvířatech, u kterých byl jako kontrola použit yohimbin, *E. longifolia* měla výrazně lepší výsledky ve všech sledovaných parametrech^{51,52}. Klinické studie ověřující erektilní účinek

extraktu Tongkat Ali na ED nejsou známy. Extrakt *E. longifolia* je složkou mnoha doplňků stravy s udávaným pozitivním účinkem na erekci.

Ginkgo biloba (jinan dvoulaločný, Ginkgoaceae). Listy jinanu se používají již více než 5000 let v tradiční čínské medicíně. Extrakt z listů, který obsahuje ginkgolidy, flavonoly, biflavony a fytosteroidy, má klinicky ověřené neuroprotektivní účinky⁵³. Výsledky ze dvou klinických studií prokázaly, že komplex látek obsažených v extraktu zlepšuje sexuální dysfunkci vyvolanou antidepressivou^{54,55}. Mechanismus účinku extraktu je vysvětlován potlačením inhibičního vlivu serotoninu na aktivitu neuronální NO-synthasy⁵⁶. Extrakt *G. biloba* je jednou ze stálých složek doplňků stravy zlepšujících sexuální funkci.

Lepidium meyenii (maka, Brassicaceae). Jídla a nápoje z hypokotylů této andské plodiny mají pozitivní vliv na zlepšení fyzické a psychické výkonnosti a reprodukční zdraví obou pohlaví. Stimulující účinek intaktních hypokotylů a celkového extraktu na sexuální aktivitu byl pozorován u myši a potkanů^{57,58}. Zvýšil se počet uskutečněných spojení a sperma-pozitivních samic a snížila se latentní perioda erekce u potkaních samců. Vliv na parametry sexuálního výkonu byl u sexuálně nezkušených samců potkana pozorovatelný již po jednorázové dávce maky⁵⁹. Podávání maky zdravým dobrovolníkům v dávce 3 g.den⁻¹ po dobu 12 týdnů vedlo ke statisticky významnému zvýšení objemu spermatu, celkového počtu spermií a jejich pohyblivosti. Sérové hladiny 17α -hydroxyprogesteronu, testosteronu, 17β -estradiolu, luteinizačního hormonu a prolaktinu zůstaly nezměněny^{60–62}. U myších samic krmených makou došlo ke zvýšení plazmatické hladiny progesteronu a testosteronu, hladina 17β -estradiolu zůstala neovlivněna⁶³. Příznivé účinky maky na sexuální funkci u obou pohlaví jsou připisovány jak optimální kombinaci obsahových látek v hypokotylu – fytosteroidů, pyridinových a imidazolových alkaloidů, alkanamidů (obr. 6), glukosinolátů a isothiokyanátů, tak i vysoké nutriční hodnotě⁶⁴. Vzhledem k doporučené denní dávce (až 12 g) jsou na trhu většinou jako doplněk stravy prodávány pouze samotné rozemleté hypokotyle peruánské provenience.

Panax ginseng (korejský ženšen, Araliaceae). V kořenech ženšenu bylo strukturně identifikováno více než 200 sloučenin. Charakteristické obsahové látky jsou ginsenosidy (triterpenové saponiny, obr. 6) (cit.⁶⁵). Droga působí stimulačně na centrální nervový systém, podporuje srdeční činnost, snižuje hladinu glukosy v krvi a zlepšuje střevní peristaltiku. Svým komplexním účinkem na hemodynamiku organismu pomáhá ke zvládnutí fyzicky i psychicky náročných situací. Pozitivní vliv ženšenu na pohlavní aktivitu se přisuzuje biologické aktivitě ginsenosidů. *In vitro* tyto látky vyvolávaly relaxaci kavernózního tělesa stimulací tvorby endotelového NO (cit.⁶⁶). Klinické studie s korejským ženšenem prokázaly zlepšení sexuálních parametrů ve srovnání s placebem^{67,68}. Účinek na ED se však projevuje až po dlouhodobém používání (8 týdnů) relativně vysokých denních dávek ženšenu ve formě prášku (900 mg.den⁻¹). Korejský ženšen je stálým doplňkem stravy



Obr. 6. Přírodní látky s dosud nedostatečně prokázaným erektilem účinkem

s udávaným účinkem na sexuální vitalitu, ale často je nahrazován jinými druhy, např. *P. vietnamensis* nebo *P. quinquefolius* či eleutorokokem ostnatým (*Eleutherococcus senticosus*, Araliaceae). Adaptogenní účinky těchto rostlin jsou zpravidla menší³⁹.

Tribulus terrestris (kotvičník pozemní, Zygophyllaceae). Letnička rostoucí v oblastech mírného a teplého klimatu Evropy a Asie a v jižní Africe. Hlavními obsahovými látkami jsou furostanolové saponiny, z nichž až 50 % je protodioscin (obr. 6) (cit.⁶⁹). *T. terrestris* byl v tradiční indické a čínské medicíně používán při onemocnění srdce, jater a ledvin a pro anabolický účinek. V současné době je vyhledávanou drogou pro zlepšení reprodukčních funkcí

u obou pohlaví⁷⁰. Předpokládá se, že protodioscin je v organismu transformován na DHEA. Studie na normálních a kastrovaných myších prokázaly stimulační vliv extraktu na sexuální chování zvířat, hladiny hormonů však nebyly sledovány^{71,72}. Extrakt měl relaxační účinek na hladké svalstvo kavernózního tělesa králíka⁷³. Klinické studie s extraktem *T. terrestris* zatím publikovány nebyly. Kotvičník se stává stále populárnějším doplňkem stravy s udávaným proerektilem efektem, zejména v kombinaci s makou a L-argininem.

L-Arginin. Semiesenciální bazická aminokyselina, endogenně syntetizovaná z karbamoylfosfátu, L-ornithinu a α -aminoskupiny kyseliny asparagové. V organismu je

L-arginin metabolizován na řadu sloučenin, např. NO-synthasou (EC 1.14.13.39) v endotelových buňkách, makrofázích a centrálním nervovém systému na NO a L-citrulin (obr. 2), v játrech arginasou (EC 3.5.3.1) na ornithin, arginin:glycin-amidino transferasou (EC 2.1.4.1) na kreatin a arginindekarboxylasou (EC 4.1.1.19) na agmatin⁷⁴. V doplňcích stravy je L-arginin ceněn zejména pro stimulační účinek na imunitní systém a ED (cit.^{9,75}). V dvojité slepé, placebem kontrolované klinické studii na 50 dobrovolnících, kterým bylo podáváno 6 týdnů 5 g L-argininu na den, 31 % probandů udávalo zlepšení erekce⁷⁶. Přímý účinek na zvýšení tvorby endotelového NO prokázán nebyl. Statisticky významné zvýšení koncentrace L-argininu, glycinu a L-ornithinu v krvi a moči bylo nalezeno u dobrovolníků až po týdenní dávce 9 g.den⁻¹ (cit.⁷⁷). Přídavek L-argininu v doplňcích stravy v dávkách 0,5–5 g L-argininu na den pravděpodobně nemá prokazatelný účinek na ED. Nicméně kombinace s látkami stimulujícími aktivitu endotelové NO-synthasy může být zajímavá, jak ukázala klinická studie se 40 dobrovolníky (věk mezi 25 a 45 roky, diagnosa ED), kterým bylo podáváno 90 dní 1,7 g L-argininu na den v kombinaci s extraktem flavonoidů (Pycnogenol[®], 80 mg.den⁻¹) z *Pinus maritima* (mořská borovice) (cit.⁷⁸). Téměř 92 % účastníků studie uvádělo na konci studie normální erekci. Podávání samotného přípravku Pycnogenol[®] 18 pacientům v denní dávce 120 mg po dobu tří měsíců vedlo ke zlepšení sexuálních funkcí u 46 % (cit.⁷⁹). Podobných výsledků bylo jednorázově dosaženo u pacientů se slabou a střední ED po jednorázovém podání kombinace 3,25 g L-argininu a 6 mg yohimbinu⁸⁰.

L-Karnitin. L-Karnitin je v organismu syntetizován z esenciálních aminokyselin lysinu a methioninu. V buňce funguje jako přenašeč acylových skupin přes mitochondriální membránu. L-Karnitin a jeho acetylderivát jsou vyhledávanými doplňky stravy⁸¹. Nedávno byla publikována klinická studie, kde u pacientů, kterým byl podáván acetyl-L-karnitin (2 g.den⁻¹) a propionyl-L-karnitin (2 g.den⁻¹) po dobu 6 měsíců se statisticky významně zlepšila erekce ve

srovnání s kontrolou a skupinou, které byl aplikován testosteron ($160 \text{ mg} \cdot \text{den}^{-1}$) (cit.⁸²). Tento dosud nepopsaný účinek L-karnitinu je vysvětlován jeho nedostatkem v důsledku poklesu androgenů u stárnoucích mužů a podporuje účelnost nejednoznačně přijímané substituční terapie testosteronem nebo její nahrazení L-karnitinem.

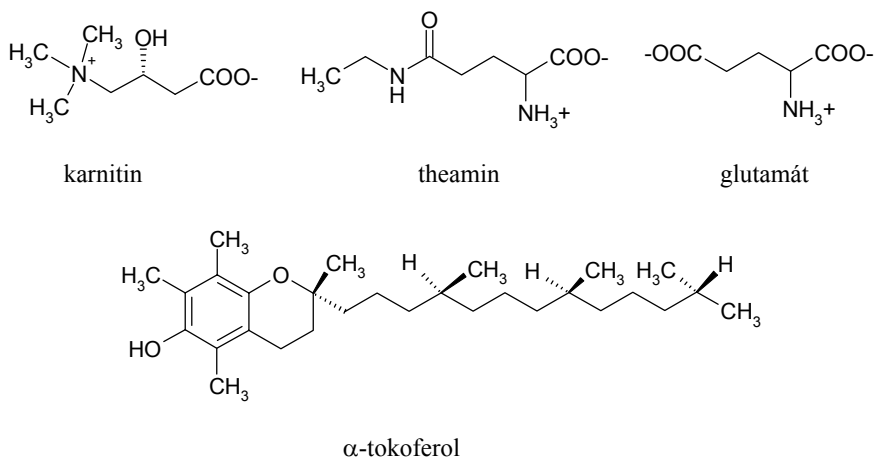
K nutraceutikům, které jsou často složkami doplňků stravy pro zlepšení sexuálních funkcí a mají pozitivní fyziologické účinky, patří theamin (obsahová látka zeleného čaje, *Camellia sinensis*), glutamát sodný a vitamin E (α -tokoferol, obr. 7).

4. Látky s výraznými toxickými účinky stimulující erekci

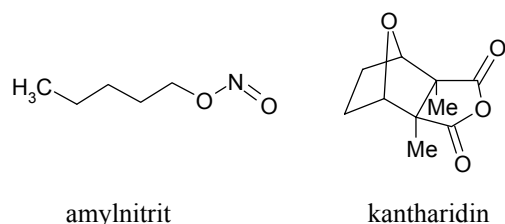
Dnes již pouze literárně známým afrodiziakem je *Lytta vesicatoria* (španělská muška) (cit.¹). Muška obsahuje silně toxický kantharidin (obr. 8, 2,3-dimethyl-7-oxabicyclo[2.2.1]heptan-2,3-dikarboxanhydrid), který je specifickým inhibitorem proteinfosfatasy 1A a 2A, enzymu v metabolismu glykogenu⁸³. Aktuálně nebezpečným přípravkem je amylnitrit (pentylnitrit), prodáváný v sexshopu pod názvem Poppers (obr. 8). Amylnitrit je při pokojové teplotě těkavý, působí jako donor NO a jeho inhalace má za následek rychle nastupující relaxaci hladkého svalstva vnitřních orgánů⁸³. Je dostupný v ampulích a jeho hlavní lékařské použití je jako protijed u otravy kyanidem. Vzácně je aplikován u akutních ledvinových a žlučnickových kolik. Inhaluje se bezprostředně před orgasmem pro zvýšení a prodloužení sexuálního potěšení. V mnoha zemích je populární na diskotékách. Působí podráždění dýchací sliznice a může vést k těžké hypotenzi s následnou zástavou srdce.

5. Lékové interakce a zdravotní kontraindikace v terapii erektilní dysfunkce

K nežádoucím farmakodynamickým interakcím dochází u všech tří inhibitorů PDE 5, sildenafilu, var-



Obr. 7. Nutraceutika podporující sexuální funkci



Obr. 8. Látky s výraznými toxickými účinky stimuluji erekci

denafilu a tadalafilu, pokud pacient užívá antihypertenziva (β -blokátory, centrální sympatolytika, periferní vazodilatancia, diuretika), antidepresiva (inhibitory monoaminooxidasy, tricyklická antidepresiva), inhibitory acetylcholinesterasy, sedativa (barbituráty), anxiolytika (benzodiazepiny), antagonisty aldosteronu (spironolakton), indometacin a klofibrát. Ze skupiny drog např. nadměrné množství alkoholických nápojů a deriváty morfinu. Absolutně kontraindikovány jsou všechny nitráty a donory NO (glycerol-trinitrát, isosorbid mono- a dinitrát, amylnitrit). Nutriční zdroje nitritů, nitrátů a L-arginin neovlivňují významně hladinu cirkulujícího NO (cit.^{84,85}). Z léků, které ovlivňují farmakokinetiku sildenafilu, jsou to zejména nespecifické inhibitory CYP3A4, azolová antimykotika (ketokonazol), antihistaminikum cimetidin (H_2 antagonist) a makrolidové antibiotikum erytromycin. Relativními kontraindikacemi pro sildenafil jsou: infarkt myokardu, cévní mozková příhoda či život ohrožující arytmie v posledních šesti měsících, nestabilní angina pectoris, městnavé srdeční selhání a tlak krve (TK) pod 95/50 mm Hg nebo nad 170/110 mm Hg, selhávání jaterních a ledvinových funkcí⁸⁴. Pro rostliny/extrakty uvedené v tomto článku nebyly v literatuře nalezeny studie o jejich interakcích s jinými xenobiotiky.

Z pohledu uživatele je zajímavý účinek furokumarinů, bergamottinu a 6,7-dihydroxybergamottinu, obsažených ve šťávě z grepů. Tyto látky ireversibilně inhibují CYP3A4 a P-glykoprotein. Tím se snižuje intestinální metabolismus sildenafilu, ale i vardenafilu a tadalafilu, zvyšuje se jejich absorpce z trávicího traktu do vnitřního prostředí a aktuální koncentrace v buňce⁸⁶. Šťávy z jiných citrusových plodů (pomeranč, citrón) látky inhibující CYP3A4 neobsahují.

6. Závěr

Erektální dysfunkce je jak sociální, tak zdravotní problém jednotlivce. Ať s tím souhlasíme nebo ne, peníze a sex jsou symbolem štěstí pro značnou část populace ve vyspělých zemích. Jaké závěry může čtenář udělat po přečtení článku? Pokud má problémy se svou sexuální aktivitou, neměl by v první fázi hledat řešení v chemii. Často stačí uspořádat si svůj životní styl a změnit dietu. Pokud tento postup nevede ke znatelnému zlepšení, pak dalším krokem jsou fytopřípravky a doplňky stravy. Staleté zkušenosti lidového léčitelství vycházejí nejen z efektu place-

Tabulka I

Příklady doplňků stravy na českém trhu s uváděným pozitivním vlivem na erekci

Doplňěk	Složení
1	L-Arginin, jinan dvoulaločný (<i>Ginkgo biloba</i>), ženšen (<i>Panax ginseng</i> , <i>P. quinquefolium</i>), vitaminy A, E, B _{1,2,5,6,12} , kyseliny listová, pantothenová, biotin, Zn, Se (pro muže)
2	L-Arginin, jinan dvoulaločný, ženšen, vitaminy A, E, B _{1,2,5,6,12} , kyseliny listová, pantothenová, biotin, Zn, Fe, Ca (pro ženy)
3	Maka (<i>Lepidium meyenii</i>)
4	Maka, jinan dvoulaločný, koenzym Q ₁₀ , vitamin E, Zn
5	Kůra bujarníku yohimbé (<i>Corynanthe yohimbe</i>), aloe, listy <i>Turnera diffusa</i> , extrakt semen cicimeku datlového (jujube), listy jinanu dvoulaločného, aminokyseliny – L-glutamová, L-arginin, L-alanin
6	Skořicovník čínský (<i>Cinnammum chinensis</i>), kokotice čínská, kustovnice, klanopraška čínská (<i>Schizandra chinensis</i>), listy maliny, kořen vítodu úzkolistého (<i>Polygala amara</i>), kořen <i>Rehmannia glutinosa</i> , kůra gumojilmu (<i>Eucommia ulmoides</i>), česnek, semeno indického lotosu, kůra hlošiny úzkolisté (<i>Elaeagnus augustifolia</i>), semeno kozince blanitého (<i>Astragalus membranaceus</i>), semeno zeravu západního (<i>Thuja occidentalis</i>), ženšen, jinan dvoulaločný

ba, ale také z biologického účinku prověřeného na mnoha generacích. Nelze zcela odmítat přírodní látky či extrakty, které jsou řazeny mezi afrodiziaka. Pokud je muž přemýšlivý a dává přednost důkazy podloženým tvrzením, pak se bude snažit vybrat ty přípravky, které mají alespoň *in vitro* prokázané účinky na receptory či další struktury centrálního nervového systému. U rostlin, které obsahují vysoké procento fytosterolů, je určitým, byť ne zcela exaktně důkazy podloženým účinkem jejich metabolická transformace na některý z pohlavních hormonů. Pouze u mála rostlinných extraktů lze předpokládat, že kromě ovlivnění struktury CNS bude jejich pozitivní fyziologický efekt spočívat i v genové expresi, resp. přímé aktivaci např. konstituční či neuronální NO-synthasy⁸⁷. Většina rostlinných extraktů vykazuje biologický účinek daný souhrnem biologických aktivit všech komponent. Při výběru fytopřípravky nebo doplňku stravy se vyplatí také kriticky posoudit jeho složení, příklady jsou uvedeny v tabulce I. Zde většinou platí, že méně znamená více. Bylo také zjištěno, že v některých případech byl inzerovaný účinek podpořen přidávkou některého z farmakologicky respektovaných inhibitorů PDE 5 (cit.⁸⁸). Chce-li mít muž jistotu, že bude mít erekci,

pak mu nezbývá, než přistoupit k lékové terapii. Na doporučení lékaře si může vybrat buď jeden z inhibitorů PDE 5 nebo léky, které účinkují přímo na hladkou svalovinu kavernózního tělesa inhibicí PDE 2-4. U těch druhých je jistota úspěchu vykoupena injekční aplikací. Stárnoucí muž se těmto úvahám nevyhne a záleží jen na rozhodnutí jednotlivce, jaký postoj k fyziologickým změnám ve svém organismu zaujme a zda je bude chtít zásahem zmenšit ovlivnit.

Autoři děkují Ministerstvu školství, mládeže a tělovýchovy za finanční podporu na řešení dané problematiky (grant MSM 151100003) a panu Vladimíru Jiráňkovi za laskavý souhlas k otištění kresby na obr. 1.

LITERATURA

1. Rättsch C.: *Byliny lásky*. Volvox Globator, Praha 1997.
2. Lue T. F.: New Engl. J. Med. 342, 1802 (2000).
3. <http://www.erekce.com>, staženo 3.2.2004.
4. Kloner R.A.: Compr. Ther. 30, 50 (2004).
5. Montorsi F., Briganti A., Salonia A., Rigatti P.: Eur. Urol. 45, 123 (2004).
6. Rosen R. C., Kostis J. B.: Am. J. Cardiol. 92, 9M (2003).
7. Brock G.: Eur. Urol. Suppl. 1, 12 (2002).
8. Lewis J.H., Rosen R., Goldstein I.: Am. J. Nurs. 103, 48 (2003).
9. MacKay D.: Altern. Med. Rev. 9, 4 (2004).
10. Kling J.: Mod. Drug Discovery 1, 31 (1998).
11. Vasta V., Beavo J.: Celltransmissions Sigma RBI 20 (1), 1 (2004).
12. Jezdinský J.: Klin. Farmakol. Farm. 13, 7 (1999).
13. Padma-Nathan H., Steers W. D., Wicker P. A.: Int. J. Clin. Pract. 52, 375 (1998).
14. Padma-Nathan H.: J. Urol. 159S, 238 (1998).
15. Steers W., Guay A. T., Leriche A., Gingell C., Hargreave T. B., Wright P. J., Price D. E., Feldman R. A.: Int. J. Impotence Res. 13, 261 (2001).
16. Mochida H., Noto T., Inoue H., Yano K., Kikkawa K.: Eur. J. Pharm. 485, 283 (2004).
17. Anderson P. C., Gommersall L., Hayne D., Arya M., Patel H. R.: Expert Opin. Pharmacother. 5, 2241 (2004).
18. Carson C.C.: Psychosomatic Med. 66, 664 (2004).
19. Brock G.B., McMahon C.G., Chen K.K., Costigan T., Shen W., Watkins V., Anglin G., Whitaker S.: J. Urol. 168, 1332 (2002).
20. Goldstein I., Young J. M., Fischer J., Bangerter K., Segerson T., Taylor T.: Diabetes Care 26, 777 (2003).
21. Ukita T., Nakamura Y., Kubo A., Yamamoto Y., Moritani Y., Saruta K., Higashijima T., Kotera J., Fujishige K., Takagi M., Kikkawa K., Omori K.: Bioorg. Med. Chem. Lett. 13, 2341 (2003).
22. Ukita T., Nakamura Y., Kubo A., Yamamoto Y., Moritani Y., Saruta K., Higashijima T., Kotera J., Takagi M., Kikkawa K., Omori K.: J. Med. Chem. 44, 2204 (2001).
23. Heaton J. P. W.: Int. J. Impotence Res. 46, S35 (2001).
24. Mirone V.G., Stief C.G.: Br. J. Urol. Int. 88, S25 (2001).
25. <http://ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>, staženo 31.8.2004.
26. Eardley I., Wright P., MacDonagh R., Hole J., Edwards A.: Br. J. Urol. Int. 93, 1271 (2004).
27. Derouet H., Osterhage J., Sittlinger H.: Urologe A 43, 197 (2004).
28. Schultheiss D., Stief C. G.: Urologe A 42, 1322 (2003).
29. Vogt H. J., Brandl P., Kockott G., Schmitz J. R., Wiegand M. H., Schadrack J., Gierend M.: Int. J. Impotence Res. 9, 155 (1997).
30. Ernst E., Pittler M. H.: J. Urol. 159, 433 (1998).
31. Anonym: Farmakoter. Inf. č. 4, 1 (2004).
32. Pepping J.: Am. J. Health-Syst. Pharm. 57, 2048 (2000).
33. Reiter W. J., Pycha A., Schatzi G., Pokorny A., Gruber D. M., Huber J. C., Marberger M.: Urology 53, 590 (1999).
34. Slob A. K., Verhulst A. C., Gijs L., Maksimovic P. A., van der Werff ten Bosch J. J.: J. Sex Marital Ther. 28, 61 (2002).
35. Dinsmore W. W., Gingell C., Hackett G., Kell P., Savage D., Oakes R., Frenzt G. D.: Br. J. Urol. Int. 83, 274 (1999).
36. Drewes S. E., George J., Khan F.: Phytochemistry 62, 1019 (2003).
37. Unger M., Stöckigt D., Belder D., Stöckigt J.: Pharmazie 52, 691 (1997).
38. Stöckigt J., Sheludk Y., Unger M., Gerasimenko I., Warzecha H., Stöckigt D.: J. Chromatogr. A 967, 85 (2002).
39. Duke J. A., Bogenschutz-Godwin M. J., duCellier J., Duke P-A. K. v knize: *Handbook of Medicinal Herbs*, str. 603. CRC Press, Boca Raton 2002.
40. Sperling H., Lummen G., Luboldt H. J., Rubben H.: Urologe A 38, 56 (1999).
41. Zvěřina J.: Zdrav. Nov. 46 (7), 5 (1997).
42. Bruneton J.: *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants*. Intercept, Andover 1995.
43. Kuroda M., Mimaki Y., Sashida Y., Umegaki E., Yamazaki M., Chiba K., Mohri T., Kitahara M., Yasuda A., Naoi N., Xu Z. W., Li M. R.: Planta Med. 66, 575 (2000).
44. Qiao L., Xin Z. C., Fu J., Liu W. J., Lin G. T., Chen S.: Chin. J. Urol. 23, 670 (2002).
45. Kim J. H., Mun Y. J., Im S. J., Lee S. Y., Lee S. W., Woo W. H.: Biol. Pharm. Bull. 25, 1000 (2002).
46. Xin Z. C., Kim E. K., Lin C. S., Liu W. J., Tian L., Yan Y. M., Fu J.: Asian J. Androl 5, 15 (2003).
47. Bryant A. T. v knize: *Zulu Medicine and Medicine Men*, str. 61. Centaur Press, Cape Town 1983.
48. Drewes S. E., Horn M. M., Munro O. Q., Dhlamini J. T. B., Meyer J. J. M., Rakuambo N. C.: Phytochemistry 59, 739 (2002).
49. Ang H. H., Hitotsuyanagi Y., Fukaya H., Takeya K.: Phytochemistry 59, 833 (2002).

50. Kuo P-C., Damu A. G., Lee K-H., Wu T-S.: *Bioorg. Med. Chem.* 12, 537 (2004).
51. Ang H. H., Lee K. L., Kiyoshi M.: *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* 14, 301 (2003).
52. Ang H. H., Ngai T. H., Tan T. H.: *Phytomedicine* 10, 590 (2003).
53. Ahlemeyer B., Krieglstein J., v knize: *Phytomedicines of Europe* (Lawson L. D., Bauer R. ed.), kap. 15, str. 210. ACS, Washington 1998.
54. Cohen A. J., Bartlik B.: *J. Sex Marital Ther.* 24, 139 (1998).
55. Kang B. J., Lee S. J., Kim M. D., Cho M. J.: *Hum. Psychopharmacol.* 17, 279 (2002).
56. Chen X., Salwinski S., Lee T. J.: *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 24, 958 (1997).
57. Zheng B. L., He K., Kim C. H., Rogers L., Shao Y., Huang Z. Y., Qien L. C., Zheng Q. Y.: *Urology* 55, 598 (2000).
58. Cicero A. F. G., Piacente S., Plasa A., Sala E., Arletti R., Pizza C.: *Andrologia* 34, 177 (2002).
59. Cicero A. F. G., Bandieri E., Arletti R.: *J. Ethnopharmacol.* 75, 225 (2001).
60. Gonzales G. F., Córdova A., Gonzales C., Chung A., Vega K.: *Asian. J. Androl.* 3, 301 (2001).
61. Gonzales G. F., Córdova A., Vega K., Chung A., Villena A., Góñez C., Castillo S.: *Andrologia* 34, 367 (2002).
62. Gonzales G. F., Córdova A., Vega K., Chung A., Villena A., Góñez C.: *J. Endocrinol.* 176, 163 (2003).
63. Oshima M., Gu Y., Tsukada S.: *J. Vet. Med. Sci.* 65, 1145 (2003).
64. Valentová K., Ulrichová J.: *Biomed. Pap.* 147, 119 (2003).
65. Bisset N. G., Wichtl M. ed. v knize: *Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals*, str. 236. CRC Press, Boca Raton 2001.
66. Murphy L. L., Lee T. J.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 962, 372 (2002).
67. Hong B., Ji Y. H., Nam K. Y., Ahn T. Y.: *J. Urol.* 168, 2070 (2002).
68. Choi H. K., Seong D. H., Rha K. H.: *Int. J. Impotence Res.* 7, 181 (1995).
69. Ganzera M., Bedir E., Khan I. A.: *J. Pharm. Sci.* 90, 1752 (2001).
70. Adimoelja A.: *Int. J. Androl.* 23 (Suppl. 2), 82 (2000).
71. Gauthaman K., Adaikan P. G., Prasad R. N. V.: *Life Sci.* 71, 1385 (2002).
72. Gauthaman K., Gamesan A. P., Prasad R. N.: *J. Altern. Complement. Med.* 9, 257 (2003).
73. Adaikan P. G., Gauthaman K., Prasad R. N., Ng S. C.: *Ann. Acad. Med. Singapore* 29, 22 (2000).
74. Garrett R. H., Grisham C. M.: *Biochemistry*. Saunders College Publishing, Fort Worth (1995).
75. Appleton J.: *Altern. Med. Rev.* 7, 512 (2002).
76. Chen J., Wollman Y., Chernichovsky T., Iaina A., Sofer M., Matzkin H.: *Br. J. Urol. Int.* 83, 269 (1999).
77. Evans R. W., Fernstrom J. D., Thompson J., Morris S. M., Kuller L. H.: *J. Nutr. Biochem.* 15, 534 (2004).
78. Stanislavov R., Nikolova V.: *J. Sex Marital Ther.* 29, 207 (2003).
79. Trebatický B., Novotný V., Muchová J., Chovanová Z., Hauserová M., Vužňáková M., Ďuračková Z., Breza J.: *22th International Conference on Polyphenols, 25–28 August, Helsinki 2004*. Polyphenols Communications, str. 175.
80. Morales A.: *World J. Urol.* 19, 251 (2001).
81. Rapport L., Lockwood B. v knize: *Nutraceuticals*, str. 77. Pharmaceutical Press, London 2002.
82. Cavallini G., Caracciolo S., Vitali G., Modenini F., Biagiotti G.: *Urology* 63, 641 (2004).
83. Merck Manual. *Kompéndium klinické medicíny*. Str. 448, 1404, 2652. X-Egem, Praha 1996.
84. Grundman M.: *Klin. Farmakol. Farm.* 13, 10 (1999).
85. Kloner R. A.: *Am. J. Cardiol.* 92, 1M (2003).
86. Bailey D. G., Dresser G. K.: *Am. J. Cardiovasc. Drugs* 4, 281 (2004).
87. Grant M. K. O., El-Fakahany E. E.: *Life Sciences* 74, 1701 (2004).
88. Schaneberg B. T., Ganzera M., Khan S., Khan I. A.: *44th Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy, Chapel Hill, NC, July 12–16, 2003*. Str. 176.

Seznam zkratek

ANP	atriální natriuretický peptid
cAMP	cyklický adenosin-3',5'-monofosfát
cGMP	cyklický guanosin-3',5'-monofosfát
CNS	centrální nervový systém
CYP	cytochrom P450
DHEA	dihydroepiandrosteron
ED	erektilní dysfunkce
eNOS	endotelová NO-synthasa
IC ₅₀	koncentrace látky inhibující 50 % aktivity enzymu
PADAM	Partial Androgen Deficiency of Aging Male
PDE	fosfodiesterasa
PGE	prostaglandin E
TK	tlak krve

K. Valentová, P. Entnerová, J. Urbaníková, and V. Šimánek (*Institute of Medical Chemistry and Biochemistry, Faculty of Medicine, Palacký University, Olomouc*): **Chemistry of Male Sexuality**

Erectile dysfunction is a problem of male aging. Many of the men concerned use drugs or alternative preparations for improvement of their sexual activity. This article is a review of synthetic compounds, natural substances and plants with a confirmed effect on sexual functions in men. Inhibitors of phosphodiesterases, compounds acting on structures in the central nervous system, medicinal plants and some nutraceuticals improving erection are discussed. The mechanism of their action at the cellular level and also in the whole organism is described; their interactions with some common drugs are mentioned as well.

TRENDY V TOTÁLNÍ SYNTÉZE ALKALOIDŮ

JOSEF HÁJÍČEK

Zentiva/Výzkumný ústav pro farmacii a biochemii, a.s.,
U kabelovny 130, 10237 Praha 10
josef.hajicek@zentiva.cz

Došlo 12.11.04, přijato 23.3.05.

Klíčová slova: alkaloidy, totální syntéza, asymetrické reakce, kaskádové/dominové reakce, biomimetické reakce, chirální katalyzátory, [4+2]-cykloadice, [3+2]-dipolární adice, enová reakce, přechodové kovy, palladium, asymetrická allylová substituce, Heckova reakce, kruhotvorná metatéza, molekulární přesmyky, vmezezení dusíku, vmezezení aminoalkylu, Michaelova adice, radikálové cyklizace, oxidativní kaplink, aktivace C-H vazby, reakce C=N vazby, Pictetova-Spenglerova reakce, Mannichova reakce, anatoxin A, cylindricin C, aspidospermidin, galantamin, histriónikotoxin, chimonanthin, kyselina α -allokainová, lucidulin, manzamin A, morfin, okaramin N, rhazinilam, spartein, strychnin, tabersonin, vallesamidin, vindorosin

Obsah

1. Úvod
2. Ditopické metody
3. Aplikace přechodových kovů
4. Další metody
5. Syntéza alkaloidů na přelomu století. Výhled

Článek se soustřeďuje na vývoj a trendy v totální syntéze alkaloidů; na konkrétních příkladech ilustruje možnosti, které využití vybraných obecných syntetických metod nabízí v totální syntéze této skupiny přírodních látek.

1. Úvod

V předchozím sdělení jsem se pokusil ukázat¹, jaké možnosti nabízí v totální syntéze alkaloidů transformace dvojnás vazby C=N jakožto specifické prostředky konstrukce skeletů těchto sekundárních metabolitů. V syntéze alkaloidů se pochopitelně uplatňuje i celá škála obecných syntetických metod. Enormní pestrost alkaloidních skeletů a omezený prostor je důvodem, proč i tento přehled je spíše pouze jakýmsi nástinem potenciálu vybraných syntetických metod než racionálním přehledem postupů syntézy této skupiny přírodních látek^{2,3}.

Z důvodu omezeného prostoru je v některých přípa-

dech ve schématech znázorněna pouze ilustrativní sekvence z mnohastupňové totální syntézy; ze stejného důvodu je rozšířená verze literatury se zachovaným číslováním umístěna na webové stránce. Přehled používaných zkratk čtenář může najít např. v cit.^{2,3}, případně v citovaných pracích; schematický zápis $rt\ 1\ h \rightarrow rfl\ (0,5\ h)\ 2\ h$ znamená, že směs byla nejprve udržována 1 h při laboratorní teplotě, potom zahřáta během 0,5 h k varu a dále zahřívána k varu 2 h.

2. Ditopické metody

Dielsova-Alderova reakce, a zvláště její intramolekulární varianta, patří k nejvýznamnějším metodám konstrukce alkaloidních skeletů (R^4). Intermolekulární varianta je úvodním stupněm již zmíněné Woodwardovy syntézy reserpinu (viz¹, Schéma 3); byla užita i ve Wenderově syntéze tohoto alkaloidu⁵, jejíž klíčovou sekvenci znázorňuje Schéma 1. Cykloadice dienu **1** s acetoxyakrylátem poskytla směs cykloaduktů, v níž stereoisomer **2** převládal (2:1). Transformace v 1,5-dien **3** umožnila termicky iniciovaný Copeův přesmyk, při němž byl generován isochinolinový karbamát **4** se správnou relativní konfigurací tří generovaných chirálních center (78 %). Karbamát **1** se uplatnil i v syntéze iboganových alkaloidů⁶. Lewisovská katalyzovaná [4+2]-cykloadice je úvodním stupněm Kishiho totální syntézy tetradotoxinu⁷.

Katalytické enantioselektivní reakce bylo užito v úvodu dosud nejefektivnější syntézy (+)-tabersoninu (**12a**) a (+)-11-methoxytabersoninu (**12b**), provedené v multigramovém měřítku, jejíž celkový výtěžek je 16 až 20 % (!)⁸, Schéma 2; pro racemickou variantu viz⁹. Cykloadice 1-aminodienů **6** s 2-ethylakroleinem v přítomnosti 5% Jacobsenova chirálního chromitého komplexu **5b** poskytla aldehyd **7** ve výtěžku 91 % s ee 95 % v 20 mmol měřítku. K uzavěru piperidinového kruhu bylo využito kruhotvorné metatézy (viz kapitola 3) odvozeného diolefinu pomocí Grubbsova katalyzátoru s vysokým výtěžkem.

Protože Fischerova indolizace ketonu odvozeného z enoletheru **8** nebyla regioselektivní (příklady¹⁰), Rawal a Kozmin připravili nitrofenylderiváty **9** reakcí **8** s NPIF ((2-nitrofenyl)fenyljodonium-fluorid), resp. jeho methoxyanalogem (57–62 % z aldehydu **7**). Redukce nitroskupiny vedla ke spontánní cyklizaci za vzniku indolů **10**, které byly transformovány přes indoleniny **11** v cílové base **12**, Schéma 2.

[4+2]-Cykloadice sekodinů byla postulována jako klíčová reakce (R^{11}) v biosyntéze některých typů *monoterpenoidních* indolových alkaloidů ($R^{12,13}$). Na jejím základě Kuehne se spolupracovníky vypracoval obecnou biomimetickou syntézu alkaloidů aspidospermanového¹⁴ (–)-vindolin¹⁵, pseudoaspidospermanového¹⁶ i iboganového¹⁷ typu;

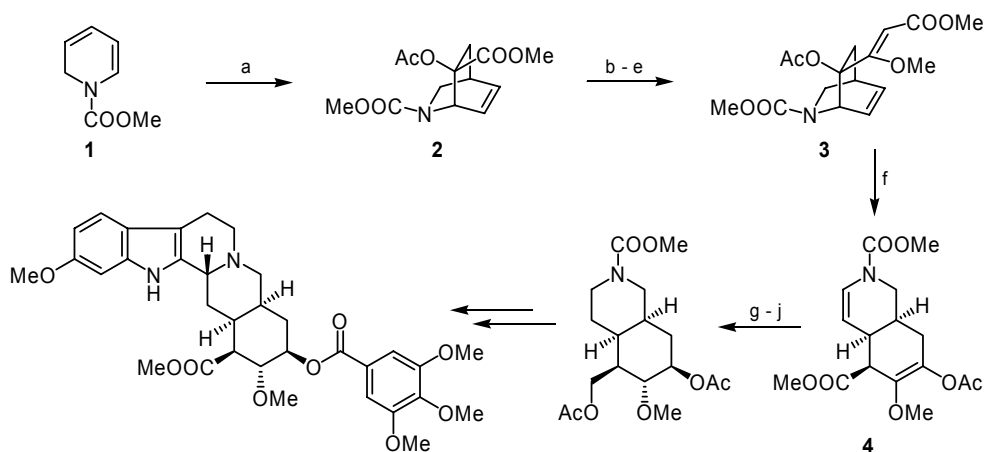


Schéma 1. Sekvence ze syntézy (+/-)-reserpinu

Činidla a podmínky: **a)** $\text{CH}_2=\text{C}(\text{OAc})\text{COOR}$, hydrochinon, PhMe, 120 °C 56 h (76 %; 2:1); **b)** LDA, MeCOOt-Bu, THF, -78 °C → rt (89 %); **c)** Ac₂O, Et₃N, DMAP; **d)** TFA, rt; **e)** CH₂N₂, MeOH, Et₂O (65 %, 3 stupně); **f)** Xylen, 243 °C 3 h (78 %); **g)** H₂, Pd/C, AcOEt (95 %); **h)** LiAlH₄, Et₂O, 0 °C 2 min (78 %); **i)** LiHMDS, THF, -10 °C, potom AcCl (přebytek), -78 °C; **j)** H₂, Pd/C, AcOEt (79 %)

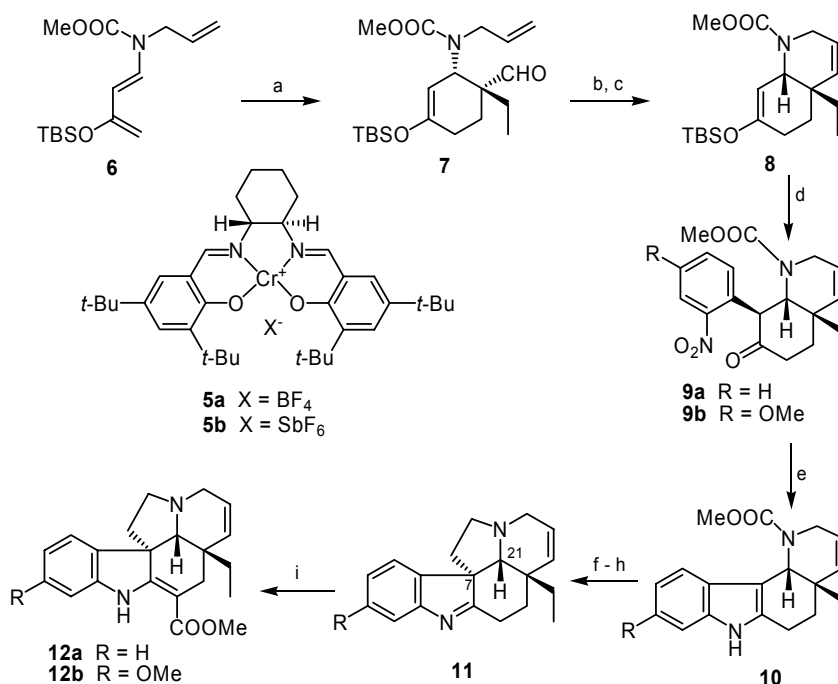


Schéma 2. Syntéza (+)-tabersoninu a (+)-11-methoxytabersoninu

Činidla a podmínky: **a)** **5b** (5 mol%), $\text{CH}_2=\text{C}(\text{Et})\text{CHO}$, 4 Å MS, CH₂Cl₂, -40 °C 2 d (91 %, 96% ee/1 mmol; 95% ee/20 mmol); **b)** Ph₃P⁺Me Br⁻, *n*-BuLi, THF, -78 °C → rt; **c)** Grubbsův rutheniový katalyzátor (4,3–7,5 mol%), CH₂Cl₂, rfl 44 h; **d)** NPIF, DMSO/THF (2:1), 0 °C → rt 3,5 h (59 % 3 stupně); **e)** TiCl₃, NH₄OAc, Me₂CO vod., rt 30 min; **f)** TMSI, CH₂Cl₂, rfl 1 h; **g)** BrCH₂CH₂OH (10 ekv.), Na₂CO₃, EtOH, rfl 15 h; **h)** MsCl, Et₃N, CH₂Cl₂, -15 °C 30 min, potom KO*t*-Bu, THF, -15 °C → rt 45 min; **i)** LDA, THF, -70 °C 40 min, potom NC.COOMe, -70 °C 20 min (39 % z **9a**)

(pseudo-biomimetická) varianta postupu (tzv. „versatily“¹⁸) byla aplikována mj. v totální syntéze strychnanových alkaloidů¹⁹ (strychnin²⁰), (+/-)-^{18,21} a (-)-koronaridinu²² a protinádorově účinných bis-indolů²³.

V enantioselektivní variantě postupu byla chiralita indukovaná skupinou fenylethylou²³, a potom ferroce-

nylethylou²⁴. Schéma 3 ukazuje aplikaci poslední generace chirálních induktorů ferrocenocyklohexylového typu v totální syntéze (-)-mossambinu (**18**)²⁵. Alkohol (+)-**14a** byl konvertován v mesylát **14b**, a následnou reakcí s univerzálním aminem **13** v chirální bazi **15**. Její reakcí s acetoxyacetaldehydem byl získán tetracyklický amin **16**

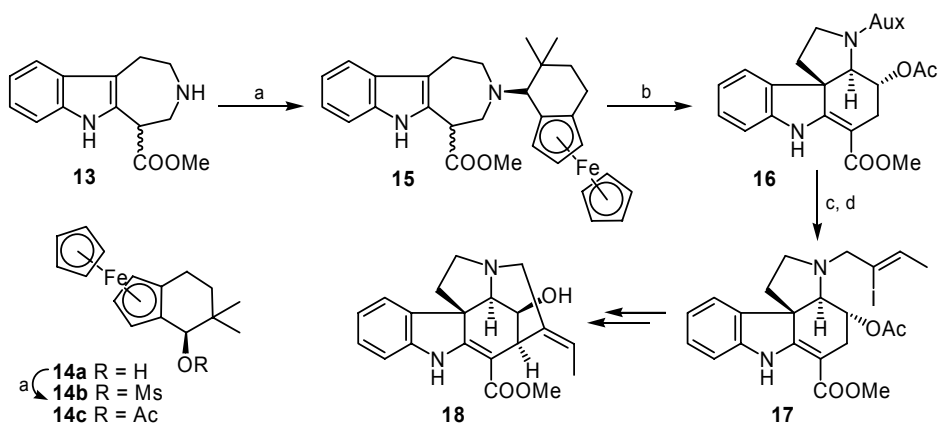


Schéma 3. Syntéza (–)-mossambinu

Činidla a podmínky: **a)** (+)-14a, MsCl, Et₃N, CH₂Cl₂, 10 °C 3 h, potom 13, *i*-PrOH, –78 °C → 10 °C 14 h (97 %); **b)** AcOCH₂CHO, PhH, rfl 22 h (16 76 %); **c)** AcOH, rt 22 h (98 %); **d)** (Z)-MeCH=C(I)CH₂Br, K₂CO₃, THF, rfl 14 h (70 %)

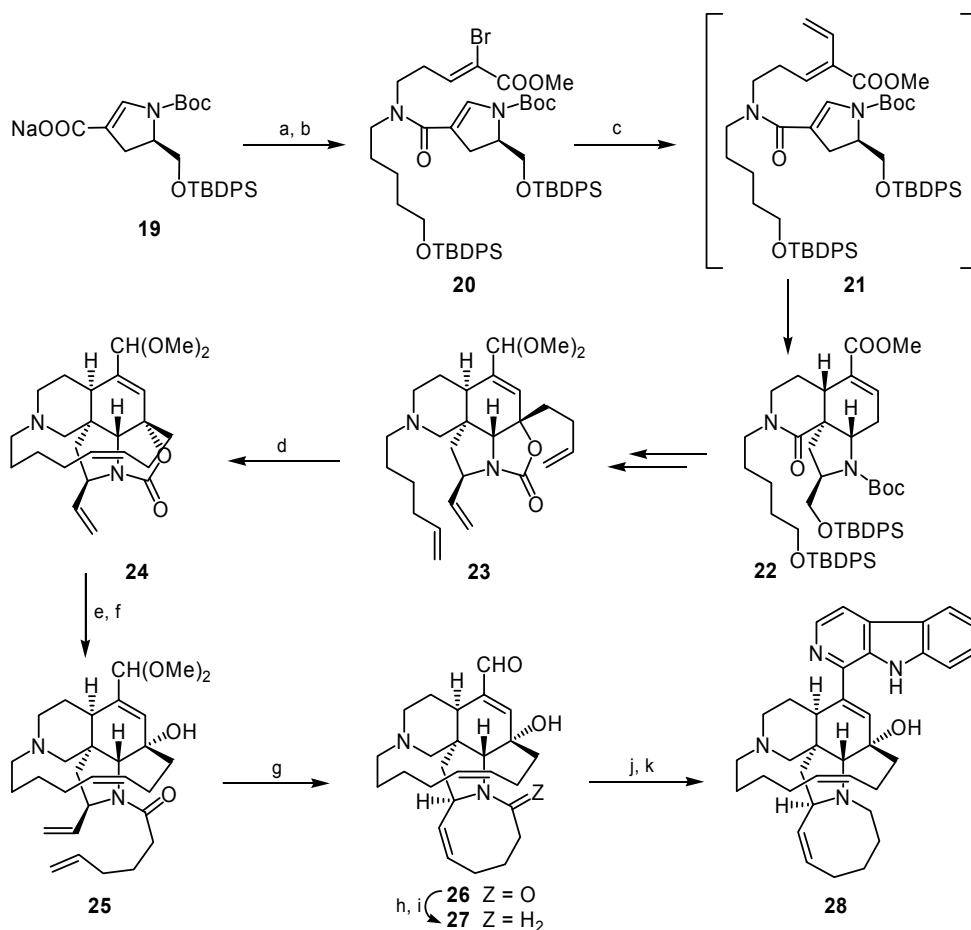


Schéma 4. Syntéza (+)-ircinalu A a manzaminu A

Činidla a podmínky: **a)** (COCl)₂, PhH, 5 °C 15 min → rt; **b)** (Z)-TBDPSONCH₂(CH₂)₃CH₂NHCH₂CH₂CH=C(Br)COOMe, Et₃N, CH₂Cl₂, 0 °C → rt (79 % 2 stupně); **c)** Bu₃SnCH=CH₂ (1,1 ekv.), [Pd(PPh₃)₄] (kat.), PhMe, rfl 30 h (68 %); **d)** Grubbsův Ru katalyzátor (kat.), CH₂Cl₂, rfl 5 h, další katalyzátor, rfl 2 h (24 67 % + (*E*)-isomer 8 %); **e)** 40% KOH/MeOH, rfl 30 min; **f)** CH₂=CH(CH₂)₃COCl, 2,6-lutidin, CH₂Cl₂, rt 30 min (75 % 2 stupně); **g)** Grubbsův Ru katalyzátor (1 ekv.), PhH, rfl 30 min (26 %); **h)** Dibal-H, cyklohexan/CH₂Cl₂ (2:1) (63 %); **i)** Dessův-Martinův perjodinan, CH₂Cl₂, 0 °C → rt 40 min (89 %); **j)** Tryptamin (4,5 ekv.), TFA (velký přebytek), 4 Å MS, CH₂Cl₂, rt 13 h (56 %); **k)** DDQ, CHCl₃, EtOH (52 %)

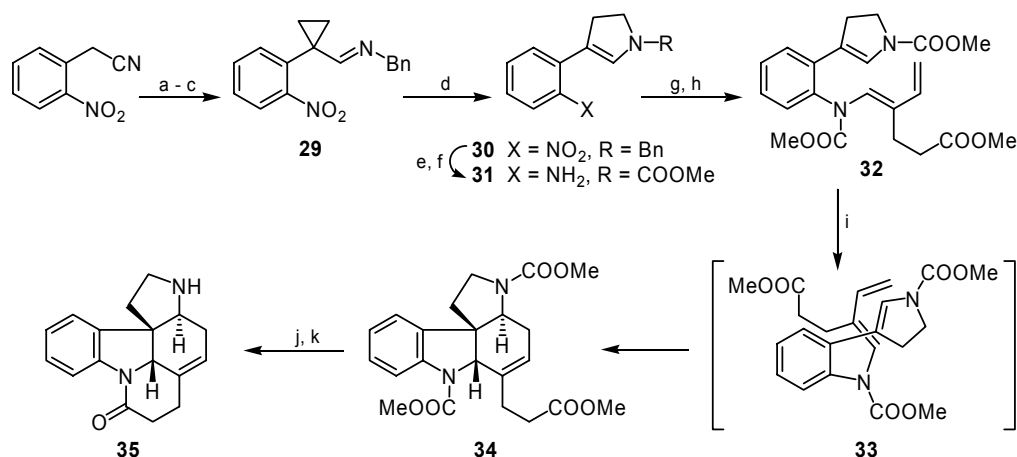


Schéma 5. Úvodní stupně Rawalovy syntézy (±)-strychninu

Činidla a podmínky: **a)** BrCH₂CH₂Br, *n*-Bu₄N⁺ Br⁻, NaOH; **b)** Dibal-H, -78 °C (96 % 2 stupně); **c)** BnNH₂; **d)** Me₃SiCl, NaI (96 %); **e)** ClCOOMe; **f)** H₄N⁺ HCOO⁻, Pd/C (86 %); **g)** MeCH=C(CH₂CH₂COOMe)CHO, bez rozpouštědla, rt; **h)** ClCOOMe, PhNEt₂ (85 % 2 stupně); **i)** PhH, 185 °C 4 h (99 %); **j)** TMSI (10 ekv), CHCl₃, rfl 5 h; **k)** MeOH, zahřívát 6 h (90 % 2 stupně)

jako 97:3 směs diastereoisomerů; opticky čistá base **16** (ee > 99 %) byla izolována v 76 % výtěžku. Následnou acetolýzou byl regenerován acetát **14c**, a uvolněný amin (98 %) byl alkylován za vzniku jodalkenu **17** (70 %), který byl radikálově cykлизován a transformován posléze v (-)-**18**. K indukci chiraloty bylo využito rovněž tryptanových derivátů²⁶.

Na alternativních způsobech generace sekodinových intermediátů jsou založeny další syntézy aspidospermanových (Szántay²⁷, Danieli²⁸, Fukuyama²⁹) a pseudo-aspidospermanových alkaloidů (Grieco³⁰, Szántay³¹). [4+2]-Cykloadiční reakce byla postulována i v biosyntéze brevianamidů a příbuzných sloučenin, čehož bylo využito např. v biomimetické totální syntéze (±)-brevianamidu B³² a (-)-VM55599³³ (R³⁴).

Intramolekulární [4+2]-cykloadice (pyrrolin jako dienofil) našla uplatnění při enantioselektivní konstrukci skeletu v Martinově totální syntéze (+)-ircinalu A (**27**) a manzaminu A (**28**)³⁵, Schéma 4. Pyrrolin **19**, dostupný z (*R*)-pyroglutamové kyseliny, byl konvertován v bromakrylát **20**, a dále pomocí Stilleho kaplinku v dien **21**, který za podmínek reakce (vroucí toluen) podlehl intramolekulární [4+2]-cykloadici. Přítomné chirální centrum indukovalo konfiguraci tří vznikajících stereocenter a tricyklický laktam **22** byl získán v 68% výtěžku jako jediný stereoisomer. Jeho transformace v triolefin **23** připravila půdu pro uzavěr 13-členného kruhu působením Grubbsova rutheniového katalyzátoru; kruhotvorná metatéza byla významně (*Z*)-selektivní (8 % (*E*)-isomeru) a v získaném azatridecenu **24** (67 %) byl po konverzi v **25** uzavřen stejnou metodou i azocinový kruh (pouze 26 % v důsledku interference s další násobnou vazbou). Laktam **26** byl konvertován v ircinal A (**27**), a nakonec s využitím Pictetovy-Spenglerovy cyklizace v manzamin A (**28**).

Intramolekulární cykloadice byla rovněž využita v Rawalově totální syntéze (±)-strychninu³⁶, jejíž strategie

se již předtím osvědčila v syntéze (±)-dehydro-tubifolidinu³⁷. Dienofil **30** byl připraven Lewisovsky katalyzovanou isomerizací iminu cyklopropankarbaldehydu **29** (96 %), Schéma 5. Odvozený anilin **31** kondenzoval se substituovaným krotanaldehydem za vzniku iminu, konvertovaného v dienamid **32**. Ten cykloadoval v termicky iniciované reakci výhradně *exo*-transitním stavu **33**, v němž byly minimalizovány nevazebné interakce, a poskytl cykloadukt **34** jako jediný stereoisomer ve výtěžku 99 %! V Bodwellově formální syntéze (±)-strychninu je klíčovým krokem *transanulární varianta* (R³⁸) s inverzními elektronovými nároky³⁹; pro další syntézy strychninu viz⁴⁰. V syntéze (+)-aloperinu⁴¹ byly dien a dienofil spojeny přes křemík (a [4+2]-cykloadice tak byla intramolekulární), v syntéze planárního aglykonu rubrolonu byla cykloadice použita opakovaně⁴².

V syntéze alkaloidů se uplatňují dieny maskované jako sulfony⁴³, jejich prekurzory mohou být benzocyklobutany⁴⁴. Obecná metoda syntézy nejen indolových alkaloidů je založena na *in situ* generovaných *o*-chinoxidimethanech (R⁴⁵).

Pestrou škálu heteradienů a heteradienofilů (R^{46,47}) zde zastupuje alespoň totální syntéza (±)-fasikularinu⁴⁸ a (±)-lepadiforminu⁴⁹, v níž vystupuje acylnitrososkupina jako dienofil v intramolekulární cykloadici. I nitroolefiny ochotně cykloadují⁵⁰; pro aplikaci kaskády s dipolární adicí v syntéze (-)-mesembrinu viz⁵¹.

Bogerův efektivní přístup k syntéze vysoce oxygenovaných alkaloidů vindolinu a vindorosinu je založen na dominové intramolekulární cykloadici⁵² 1,3,4-oxadiazolů **37**, Schéma 6. Termicky iniciovaný proces je zahájen [4+2]-cykloadicí, přičemž primární cykloadukt **38** ztrácí molekulu dusíku *retro*-Dielsovou-Alderovou reakcí. Generovaný ylid **39** podléhá následně *endo*-[3+2]-adici na indol (dipolarofil) a poskytuje hexacyklický produkt **40** jako výhradní stereoisomer (72–79 %). Během této sekvence

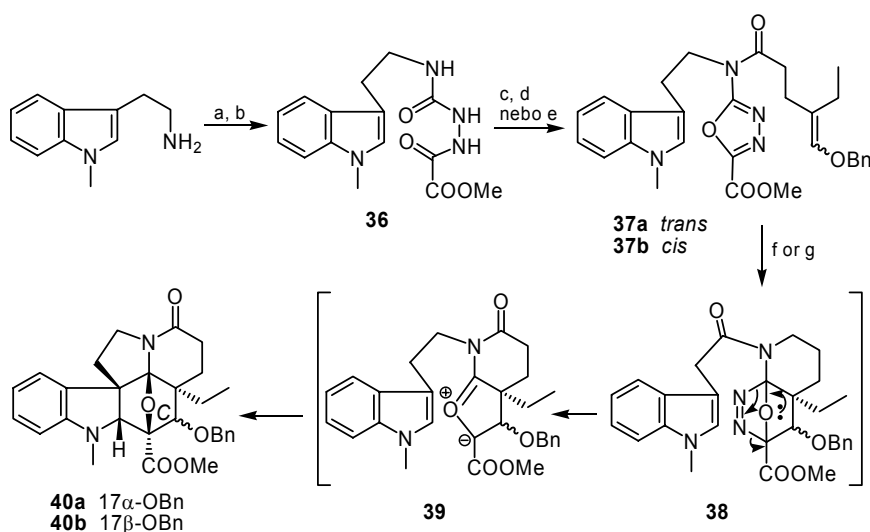


Schéma 6. Přístup k syntéze (±)-vindorosinu

Činidla a podmínky: **a)** $(\text{Im})_2\text{CO}$, CH_2Cl_2 , THF, $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{rt}$ přes noc (75 %); **b)** $\text{NH}_2\text{NHCOOMe}$, AcOH, THF, $40\text{ }^\circ\text{C}$ 16 h (65 %); **c)** TsCl, Et_3N , CH_2Cl_2 , rt 16 h (65 %); **d)** (*E*)-5-benzyloxy-4-ethyl-pent-4-enová kyselina, EDCI, CH_2Cl_2 , $0\text{ }^\circ\text{C}$ 5 min, potom DMAP, rt 5 h (37a 75 %); **e)** (*Z*)-5-benzyloxy-4-ethyl-pent-4-enová kyselina, EDCI, DMAP, CH_2Cl_2 , $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow 25\text{ }^\circ\text{C}$ 3 d (37b 69 %); **f)** 37a, 1,2-dichlorbenzen, r.f. 24 h (40a 79 %); **g)** 37b, 1,3,5-triisopropylbenzen, $230\text{ }^\circ\text{C}$ 32 h (40b 69 %)

jsou vytvořeny 3 (4) kruhy, přičemž relativní konfigurace všech šesti (!) chirálních center na centrálním kruhu C je cíleně řízena.

Zmíněná *dipolární* [3+2]-adice se vyvinula v jednu z nejvýznamnějších metod syntézy alkaloidů (R^{53}). Cykloadice nejčastěji užívaných nitronů byla aplikována např. v syntéze izidinových alkaloidů⁵⁴, (±)-kokainu⁵⁵ a (±)-porantheridinu⁵⁶. Dnes již klasickou aplikaci nitronů představuje Oppolzerova syntéza (+)-lucidulinu (**44**)⁵⁷, Schéma 7. V ní byl hydroxylamin **41**, odvozený od (+)-(*R*)-pulegonu, konvertován v nitron **42**, který reagoval přednostně v konformaci **42a**, a poskytl tetracyklický cykloadukt **43a** v 87% výtěžku.

Využití dipolárních adicí v syntéze spirocyklických

alkaloidů ilustruje⁵⁸ totální syntéza (–)-histrionikotoxinu (**50**), Schéma 8. Opticky aktivní hydroxylamin **45b** poskytl adici na trojnou vazbu nitron **46**. Následující ochrana [3+2]-adici styrenu umožnila výstavbu akrylonitrilu **47** (85 % ze **45b**). Termolýzou byl regenerován nitron, který reagoval výhradně v konformaci **48a** a poskytl stereoselektivně produkt **49a** v 82% výtěžku. Poznamenáme, že v případech, kdy dipolarofil není substituován EW(elektrony odtahující)-skupinou, jsou výhradními produkty isomerní isoxazolidiny typu **49b**. Nitron **46** ($\text{CN} \rightarrow \text{C}\equiv\text{C-TMS}$) poskytl přes **48b** 83 % odpovídajícího **49b**, jenž nebyl termicky ekvilibrovatelný⁵⁹ na skelet **49a**; aplikace např. v syntéze isomeru lepadiforminu⁶⁰.

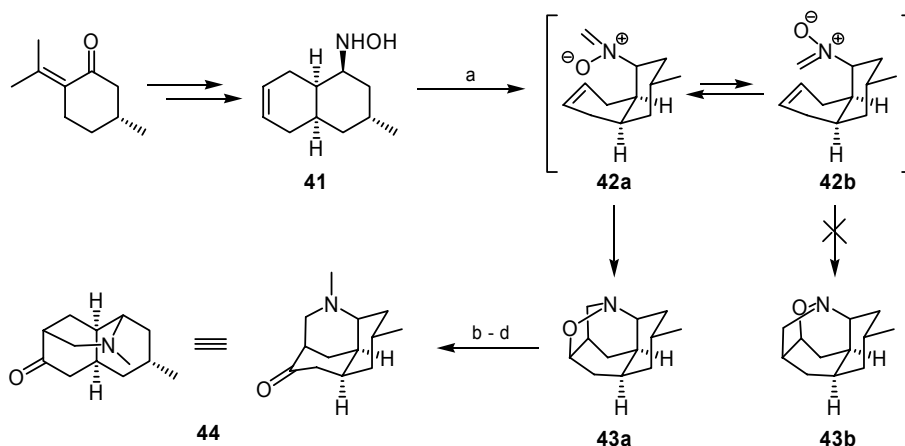


Schéma 7. Syntéza (+)-lucidulinu

Činidla a podmínky: **a)** $(\text{CH}_2\text{O})_n$, 4 Å MS, PhMe, $115\text{ }^\circ\text{C}$ 4 h (87 %); **b)** MeOSO_2F , Et_2O , $0\text{ }^\circ\text{C}$ 30 min (96 %); **c)** LiAlH_4 , THF, $25\text{ }^\circ\text{C}$ 4,5 h (98 %); **d)** Jonesovo činidlo, Me_2CO , $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow 25\text{ }^\circ\text{C}$ 1 h (99 %; 93 % 3 stupně)

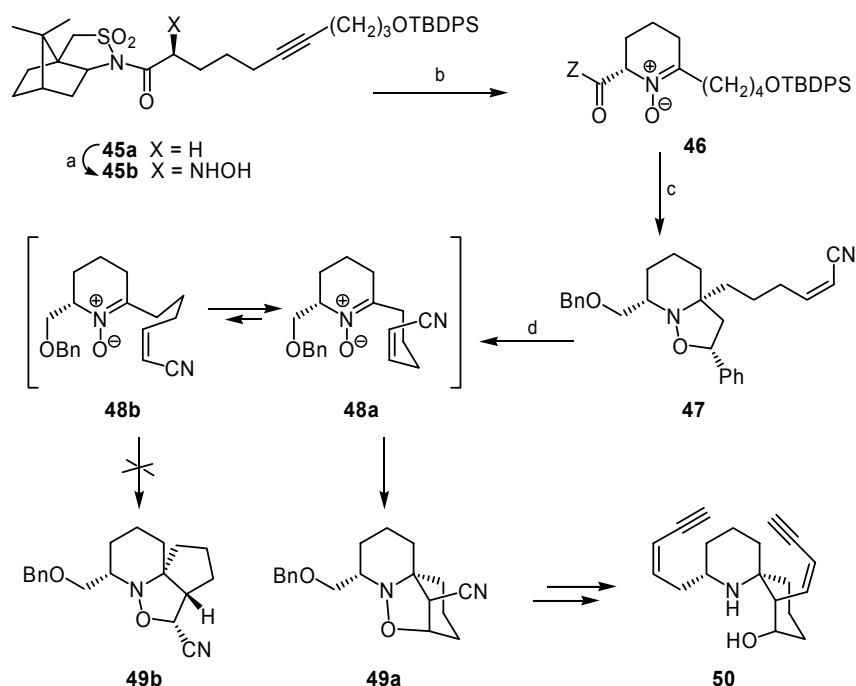


Schéma 8. Syntéza (–)-histrionikotoxinu

Činidla a podmínky: **a)** NaHMDs, THF, -78°C 1,25 h, potom 1-chlor-1-nitrosocyklohexan, THF, -78°C 0,5 h, potom 2N HCl, $\rightarrow 25^{\circ}\text{C}$ 1 h (70 %); **b)** PhMe, 75°C 7 h; **c)** Styren (bez rozp.), 80°C 6 h (85 % 2 stupně); potom modifikace řetězce; **d)** PhMe (zatav. zkumavka), 190°C 3,5 h (82 %)

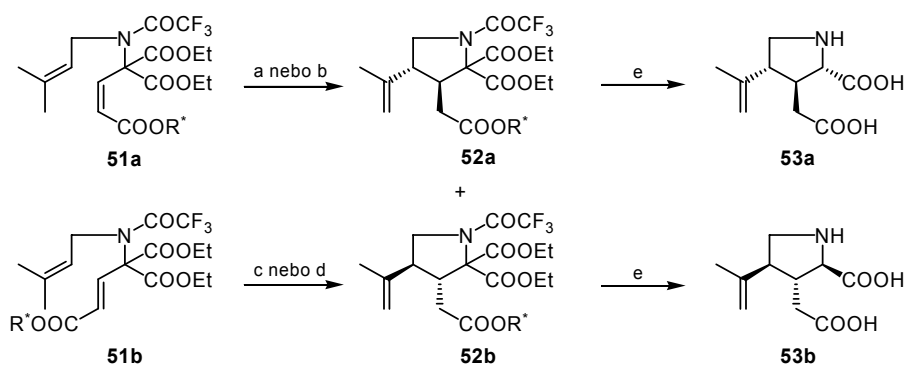


Schéma 9. Syntéza (+)- a (–)-α-alkokainové kyseliny

Činidla a podmínky: **a)** PhMe, 70°C 80 h, nebo bez rozpouštědla, 180°C 15 min (**52**:*cis*-isomer 4:1, **52a**:**52b** 1:1); **b)** Me_2AlCl , hexan, CH_2Cl_2 , $-78^{\circ}\text{C} \rightarrow -35^{\circ}\text{C}$ 18 h (**52** (60 %):*cis*-isomer 100:0, **52a**:**52b** 95:5); **c)** bez rozpouštědla, 180°C 15 min (**52**:*cis*-isomer 1:1, **52a**:**52b** 1:1); **d)** Me_2AlCl , hexan, CH_2Cl_2 , -35°C 20 min (**52** (71 %; 81 % brsm):*cis*-isomer >95:<5, **52b**:**52a** 89:11); **e)** 1 N NaOH, EtOH/voda (1:1), 100°C 20 h, potom HCl vod., pH $\rightarrow$ 5, $110^{\circ}\text{C} \rightarrow 3$, 110°C (**53a** 68 %; **53b** 62 %)

Syntéza (–)-krambescidinu 359 je založena na násobném užití dipolární adice chirálního nitronu⁶¹, opakovaná dipolární adice nitronů byla užita v syntéze isosparteinu⁶² a oligocyklických guanidinových alkaloidů⁶³. Pomocí transanulární adice nitronu byl vybudován spirocyklický systém pinnaové kyseliny⁶⁴.

V syntéze alkaloidů nachází uplatnění pestrá škála dipólů, zahrnující nitriloxidy (např. sekoergolinový alkaloid (+)-paliklavin⁶⁵) a azidy, kterých využil T. Hudlický⁶⁶ v syntéze mnoha pyrrolizidinových alkaloidů. Brilantní

aplikací kaskády reakcí je Padwův (R^{67}) přístup k syntéze vindolinu⁶⁸, v němž byla tvorba dipolu obdobného **39** indukována působením Rh^{2+} na diazolaktyam.

Enová reakce (R^{69}) rovněž nachází uplatnění v syntéze alkaloidů, přičemž vedle olefinických enofilů nachází uplatnění i jejich heteroanalogy; příkladem je syntéza ($\pm$)-krinanu⁷⁰, v níž bylo využito *N*-acylované nitroso skupiny při uzavěru pyrrolidonového kruhu. Ke klasickým aplikacím patří Oppolzerova syntéza (–)-α-kainové⁷¹ a obou enantiomerů α-alkokainové kyseliny (**53**), jejichž

syntéza⁷² je založena na asymetrické indukci při enové reakci nenasyčených esterů s (–)-8-fenylmentolem **51**, přičemž zásadně důležitým se ukázal být způsob iniciace reakce, Schéma 9. Zatímco při termolýze *cis*- i *trans*-esterů **51** byl získán racemický *trans*-pyrrolidin **52**, doprovázený značným množstvím *cis*-isomeru, v přítomnosti dimethylaluminiumchloridu byl průběh zásadně odlišný: *cis*-Ester **51a** poskytl výhradně *trans*-produkt (60 %) s poměrem **52a:52b** 95:5, a nakonec přirozenou (+)- α -allokainovou kyselinu (**53a**), zatímco z *trans*-isomeru **51b** byl za obdobných podmínek, při poměru *trans* (71 %)/*cis* pyrrolidinů > 95 : < 5, získán produkt **52b**, doprovázený větším množstvím enantiomeru **52a** (89:11); ester **52b** byl obdobně transformován v (–)- α -allokainovou kyselinu (**53b**), viz rovněž R⁷³.

3. Aplikace přechodových kovů

Pokrok organické syntézy je nejvýrazněji charakterizován intenzivním rozvojem chemie přechodových kovů a stále širším využíváním chirálních ligandů/katalyzátorů. Reakce katalyzované přechodovými kovy⁷⁴, a zvláště palladiem, se staly nedílnou součástí organické syntézy⁷⁵. Již klasickou metodou se stala katalyzovaná *allylová substituce*, a zvláště její *asymetrická varianta* (R^{76,77}). Z četných aplikací budiž zmíněna syntéza tetraponerinů⁷⁸, toxických složek vosích sekretů, kde bylo metody užito opakovaně, jak ilustruje příklad (+)-tetraponerinu T4 (**61**) a T8 (**62**), Schéma 10. Allylová substituce dikarbonátu **54** 2-nitrobenzensulfonamidem Ns-NHCH₂CH₂CH=CH₂ při –60 až –35 °C v přítomnosti 0,75 % katalyzátoru připraveného z [Pd₂(dba)₃.CHCl₃] a C₂-symetrického ligandu **55** po-

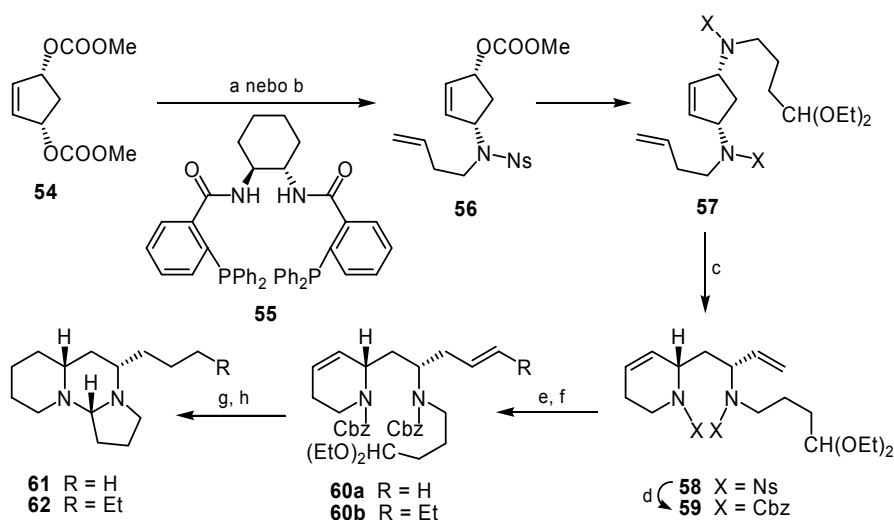


Schéma 10. Syntéza (+)-tetraponerinu T4 a T8

Činidla a podmínky: **a**) Ns-NHCH₂CH₂CH=CH₂ (1 ekv), Et₃N (2,7 ekv), THF, –60 °C, potom roztok [Pd₂(dba)₃.CHCl₃] (0,75 %) a **55** (3 %) v THF (15 min), –60 °C 1 h → –35 °C (**56** 89 %; 98,5 % ee); **b**) Ns-NHCH₂CH₂CH=CH₂ (1 ekv), Et₃N (4 ekv), THF, –60 °C, potom roztok [Pd₂(dba)₃.CHCl₃] (1,5 %) a **55** (6 %) v THF (15 min), –60 °C 1 h → –35 °C → rt, potom dppb (6 %), rt 10 min, potom Ns-CH₂CH₂CH₂CH(OEt)₂ (1 ekv), rt 3 h (**57** 79 %); **c**) [(Cy₃P)₂Ru(=CHPh)Cl₂] (5 %), probublávat CH₂=CH₂, CH₂Cl₂, 35 °C 48 h (79 % + **57** 15 %); **d**) K₂CO₃, PhSH (2,5 ekv), DMF, 70 °C 30 min → rt, přidat Cbz-Cl (2,5 ekv), rt 10 min (96 %); **e**) O₂, PdCl₂ (10 mol%), CuCl (0,5 ekv), DMF vod, rt 6 h (76 %); **f**) CrCl₂, DMF (1 ekv), THF, rt 30 min, potom RCHI₂, potom **59**, rt 30 min (**60a** 65 %; **60b** 80 %); **g**) H₂, 10% Pd/C, EtOH, rt 8 h; **h**) 5% HCl vod, rt 12 h (**61** 80 %; **62** 86 %)

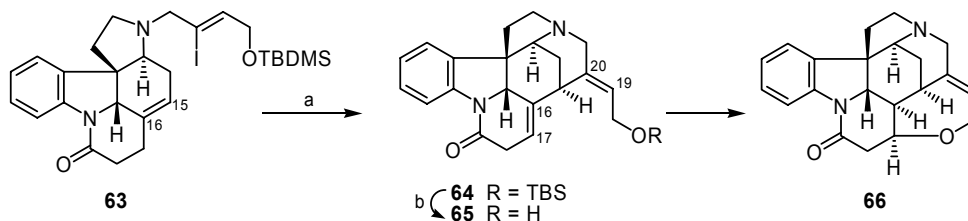


Schéma 11. Dokončení Rawalovy syntézy (±)-strychninu

Činidla a podmínky: **a**) Pd(OAc)₂ (0,3 ekv.), *n*-Bu₄N⁺ Cl[–], K₂CO₃, DMF, 70 °C 3 h (74 %); **b**) 2 N HCl, THF (96 %).

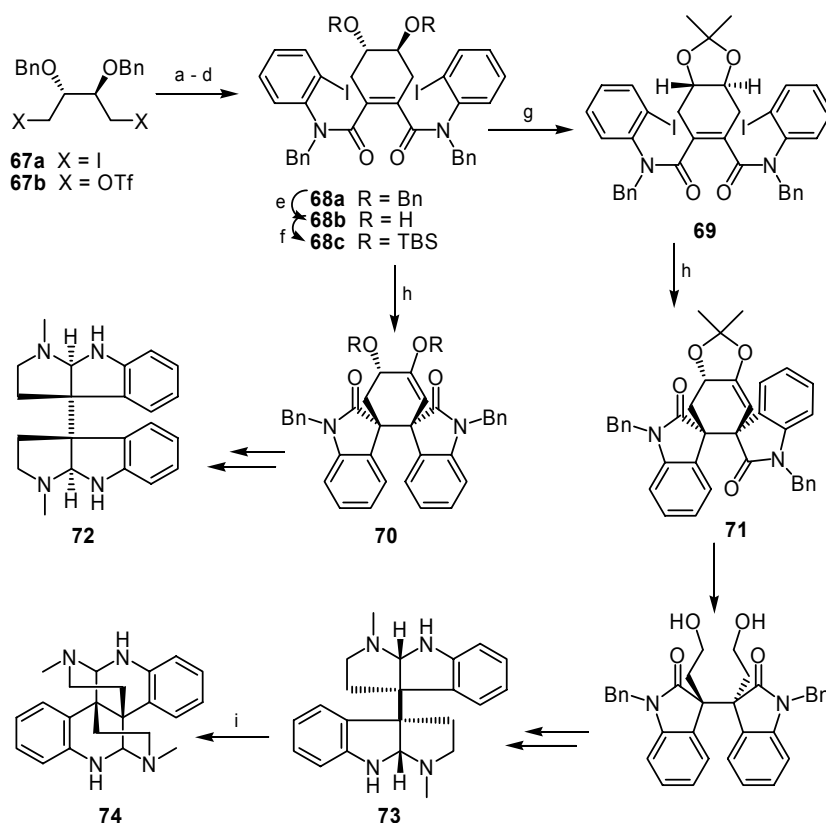


Schéma 12. Syntéza meso- a (–)-chimonanthinu a (+)-kalykanthinu

Činidla a podmínky: **a**) (CH₂COOMe)₂, LDA, **67a**, THF/HMPA (9:1), –78 °C 20 min (46 %); **b**) LDA, THF, –78 °C 10 min, potom I₂ (72 %); **c**) 2-Jodanilin, Me₃Al, PhMe, rt (92 %); **d**) NaH, BnBr, DMF (87 %); **e**) BCl₃, –78 °C (70 %); **f**) TBDMSCL, imidazol, CH₂Cl₂ (86 %); **g**) **68b**, Me₂C(OMe)₂, CSA (80 %); **h**) [PdCl₂(PPh₃)₂] (10 %), Et₃N, DMA, 100 °C (**68c** → **70** 71 %; **69** → **71** 90 %); **i**) AcOH, rfl (60 %)

skytla produkt (–)-**56** v 89% výtěžku s ee 98,5 %. Ukázalo se, že druhou substitucí Ns-CH₂CH₂CH₂CH(OEt)₂ je možno provést „one-pot“ způsobem, za předpokladu, že je směs nejprve ohřáta na laboratorní teplotu (rt) a vyměněn ligand za dppb (katalyzátor již nemusí být chirální, desymetrizace provedena v 1. stupni!); (–)-sulfonamid **57** byl získán v celkovém 79% výtěžku. Následující kruhotvorná metatéza (Grubbsův katalyzátor 1. generace), ve skutečnosti kombinace ROM(ring-opening)-RCM(ring-closing), vedla k rovnovážné směsi a získaný (+)-sulfonamid **58** (79 %) byl konvertován v karbamát **59**. Protože homologizace vinylu metatézou selhala pro nereaktivnost, byl tento oxidován dle Wackera na aldehyd (**76** %), a potom konvertován nebasicky dle Takaiho (RCHI₂, CrCl₂) v olefin. Získané (+)-alkeny **60** (65–80 %) byly transformovány s uplatněním stereoselektivních Mannichových procesů v (+)-tetraponerin T4 (**61**; 80 %) a (+)-tetraponerin T8 (**62**; 86 %).

Přechodové kovy umožňují uskutečňování elegantních, jinak těžko realizovatelných transformací. Ilustrativním příkladem je aplikace Heckovy reakce v pozdních stupních Rawalovy syntézy³⁶ (±)-strychninu (**66**), Schéma 11. Alkylací aminu **35** (Schéma 5) 2-jodallylbromidem

získaný vinyljodid **63** (87 %) intramolekulárně cyklizoval v přítomnosti katalytického Pd(OAc)₂ za stereoselektivního uzavření kruhu D a instalace (E)-19,20-dvojně vazby. Neméně významné je současné zavedení 16,17-násobné vazby, které umožnilo, aby získaný produkt **64** (**74** %) byl po odchránění (→ **65**, isostrychnin) konvertován v cílovou molekulu s využitím předchozích poznatků Prelogových⁷⁹. Obdobným způsobem budovali kruh D strychninu Stork i další autoři, viz⁴⁰.

Dvojnásobné Heckovy cyklizace využil Overman se spolupracovníky⁸⁰ v syntéze meso- (**72**) a (–)-chimonanthinu (**73**), a (+)-kalykanthinu (**74**), Schéma 12. První Heckova cyklizace vyžaduje inserci tetrasubstituovaného olefinu a generuje kvarterní centrum (R⁸¹); druhou cyklizací je generováno další kvarterní centrum v sousedství prvního. Přitom se ukázalo, že celý proces je možno provádět s vysokou enantioselektivitou a jednoduchým způsobem řídit diastereoselektivitu: Prekurzor **68a**, přístupný z chirálního synthonu **67a**, byl konvertován jednak v bisilyloxyderivát **68c**, jednak v acetamid **69**. Zatímco diodderivát **68c** cyklizoval za podmínek Heckovy reakce (10 % [PdCl₂(PPh₃)₂]) za výhradního vzniku bis-spirocyklu **70** (71 %), analogická reakce **69** poskytla diastereoisomerní

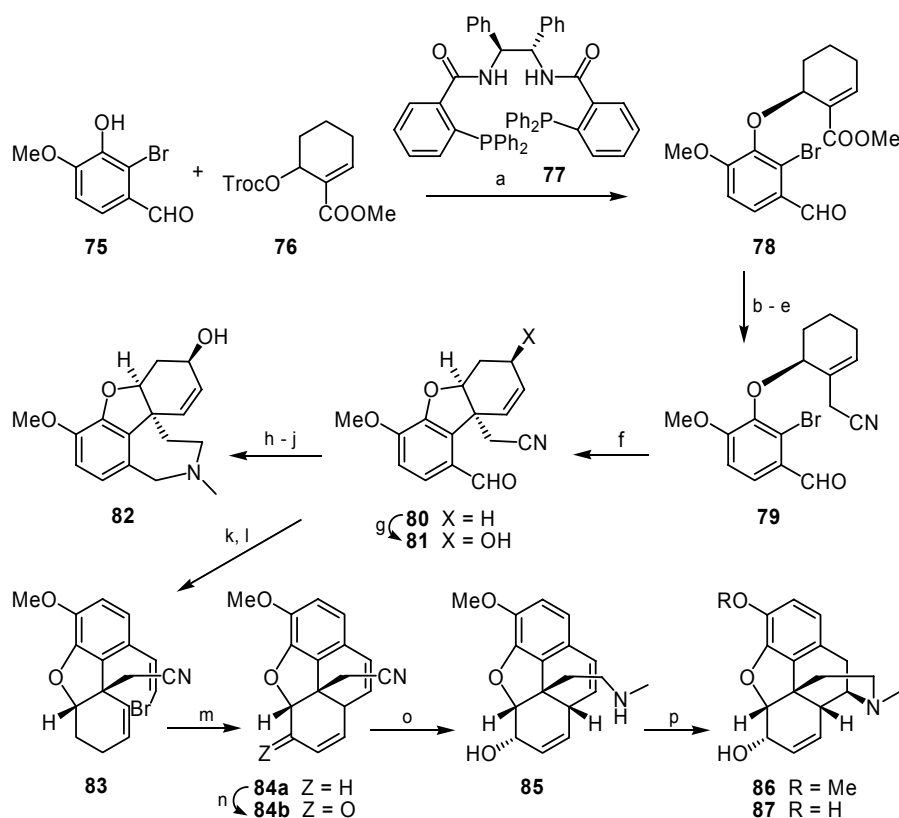


Schéma 13. Syntéza (–)-galantaminu a (–)-morfinu

Činidla a podmínky: **a)** 77 (3 %), $[\eta^3\text{-C}_3\text{H}_3\text{PdCl}]_2$ (1 %), Et_3N , CH_2Cl_2 , rt (72 %, 87–88% ee); **b)** TsOH (5 %), $\text{CH}(\text{OMe})_3$, MeOH ; **c)** Dibal-H, PhMe , -78°C (85 % 2 stupně); **d)** Ph_3P , $\text{Me}_2\text{C}(\text{OH})\text{CN}$, DIAD, Et_2O ; **e)** TsOH (20 %), THF vod. (76 % 2 stupně, 96% ee po rekryst.); **f)** $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (15 %), dppp (15 %), Ag_2CO_3 (přebytek), PhMe , 107°C 24 h (**80** 91 %); **g)** SeO_2 , NaH_2PO_4 , dioxan, 150°C 3 h (57 %, 64 % brsm, dr 10:1); **h)** MeNH_2 , MeOH ; **i)** Dibal-H (4 ekv.), potom NaH_2PO_4 vod.; **j)** NaBH_3CN (62 % **79** + 6 % isomer); **k)** **80**, CBr_4 , Ph_3P , CH_2Cl_2 , 0°C 10 min (91 %); **l)** $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4]$ (5 %), Bu_3SnH , PhMe (88 %); **m)** $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (15 %), dppp (15 %), Ag_2CO_3 (přebytek), PhMe , 107°C 4 h (**84a** 65 %, 74 % brsm); **n)** SeO_2 1 ekv., křemenný písek, dioxan, 75°C 40 min, potom SeO_2 1 ekv.), 75°C 40 min, potom DMP, CH_2Cl_2 , rt 3 h (58 %); **o)** Dibal-H, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Et}_2\text{O}$ (1:1), -78°C 2 h $\rightarrow$ 0°C 1 h, potom NH_4Br , MeNH_2 , MeOH , $\rightarrow$ rt 2 h, potom NaBH_4 , $0^\circ\text{C} \rightarrow$ rt přes noc (89 %); **p)** $n\text{-BuLi}$, $i\text{-Pr}_2\text{NH}/\text{THF}$ (1:5), $-78^\circ\text{C} \rightarrow$ rt, potom $h\nu$, rt 6 h (57 %)

sloučeninu **71** jako jediný produkt a v 90% výtěžku. Vysvětlení spočívá v konformaci substrátů, kde u **68c** jsou obě silyloxyskupiny přednostně axiální, zatímco dioxolan fixuje oba substituenty na cyklohexenovém kruhu diekvatoriálně. Sloučeniny **70** a **71** byly konvertovány v *meso*-chimonanthin (**72**), resp. v (–)-chimonanthin (**73**), který byl kysele isomerizován přes indolenin v (+)-kalykanthin (**74**). První dva alkaloidy byly rovněž připraveny s využitím enantioselektivní dialkylace ditriflátem **67b**, *meso*-chimonanthin (**72**) stereoselektivní reduktivní dialkylací⁸³ s využitím SmI_2 (R^{84}); metodologie byla aplikována rovněž v syntéze příbuzných „trimerních“⁸⁵ ((–)-idiospermulin, (–)-hodgkinsin a (–)-hodgkinsin B) a „tetramerních“ alkaloidů⁸⁶ ((–)-kvadrigemin C a (–)-psycholein).

Efektivitu užití přechodových kovů v syntéze alkaloidů dále demonstruje Trostův přístup k syntéze (–)-galantaminu⁸⁷ (**82**) a (–)-morfinu⁸⁸ (**87**) ze společného intermediátu **80**, Schéma 13. Optická aktivita byla indukována již na počátku syntézy Pd-katalyzovanou allylovou substitucí

karbonátu **76** fenolem **75** v přítomnosti ligandu **77** (72 %, 87–88% ee). Účelem konverze získaného akrylátu **78** na olefin **79** (96% ee) byla eliminace EW-vlivu methoxykarbonylové skupiny na zamýšlenou Heckovu reakci. Při užití katalytického $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ a dppp v přítomnosti přebytku Ag_2CO_3 byl Heckův produkt **80** získán v 91% výtěžku. Jeho allylová oxidace (SeO_2) a uzavěr azepinového kruhu v kyanaldehydu **81** „one-pot“ způsobem (62 %) dokončily 8-stupňovou syntézu (–)-**82** v celkovém výtěžku 14,8 % (poznamenejme, že recentní, pro velkotonážní výrobu adaptovaná syntéza (–)-**82** je založena na biomimetickém oxidativním kaplinku fenolů⁸⁹).

Při syntéze morfinu⁸⁸ (Schéma 13) byl benzaldehyd **80** konvertován v *cis*-bromstyren **83** (91 %), který intramolekulární Heckovou vinylicí poskytl diolefin **84a** (64 %), přednostně oxidovaný SeO_2 (a potom DMP) za vzniku enonu **84b** (58 %). Zbývající kruh byl uzavřen ozařováním (jednoelektronový přenos) odvozeného sekundárního aminu **85** v přítomnosti silné base ($n\text{-BuLi}$ nebo

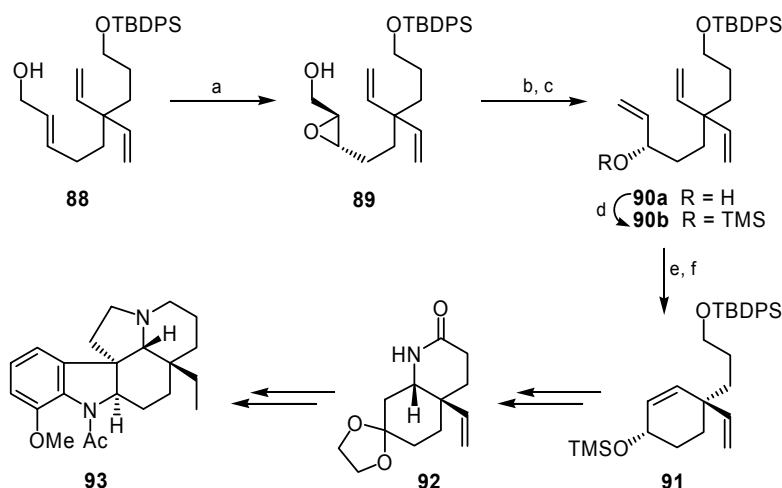


Schéma 14. Asymetrická kruhotvorná metatéza v syntéze (–)-aspidosperminu

Činidla a podmínky: **a)** (+)-DIPT, $\text{Ti}(\text{Oi-Pr})_4$, TBHP, 4 Å MS, CH_2Cl_2 , $-25\text{ }^\circ\text{C}$ 24 h (92%); **b)** I_2 , Ph_3P , imidazol, PhH, rt 35 min (95%); **c)** Zn, AcOH, $50\text{ }^\circ\text{C}$ 30 min (96%); **d)** TMSCl, Et_3N , CH_2Cl_2 , rt 30 min (98%); **e)** Grubbsův katalyzátor 1. generace (0,1 eq), CH_2Cl_2 , rt 48 h; **f)** 1% HCl vod./THF (1:3), rt 30 min (87%, 2 stupně)

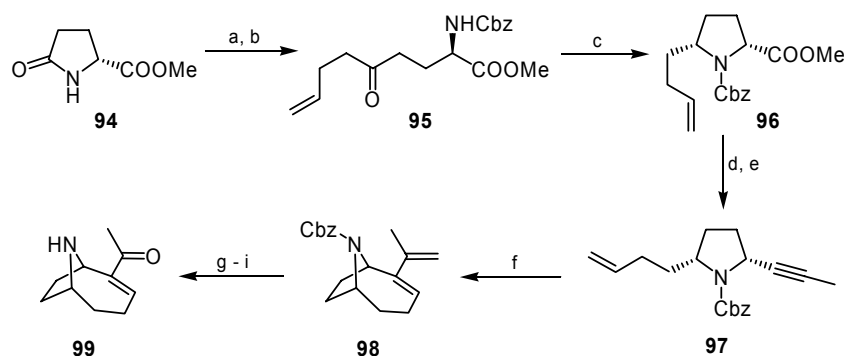


Schéma 15. Enantioselektivní syntéza (+)-anatoxinu A

Činidla a podmínky: **a)** LiHMDS, CbzCl, $-78\text{ }^\circ\text{C}$ 2 h $\rightarrow$ rt 1 h (kvant.); **b)** $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{MgBr}$, TMEDA, THF, $-78\text{ }^\circ\text{C}$ 2 h $\rightarrow$ $0\text{ }^\circ\text{C}$ 1 h (73 %); **c)** $\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$, Ph_3SiH , CH_2Cl_2 , $-78\text{ }^\circ\text{C}$ 2 h $\rightarrow$ rt 1 h (99 %); **d)** Dibal-H, PhMe, $-78\text{ }^\circ\text{C}$ 2 h, potom $\text{MeCOC}(\text{N}_2)\text{P}(\text{O})(\text{OMe})_2$, Cs_2CO_3 , BnOH, $-78\text{ }^\circ\text{C}$ 2 h $\rightarrow$ rt 1 h (62 %, one-pot); **e)** NaHMDS, MeOTf, THF, $-78\text{ }^\circ\text{C}$ 2 h $\rightarrow$ rt 1 h (97 %); **f)** Grubbsův katalyzátor 2. generace (0,1 eq), CH_2Cl_2 , rt 48 h (87 %); **g)** OsO_4 , Et_3N , THF, $-78\text{ }^\circ\text{C}$ 2 h $\rightarrow$ rt 1 h, potom NaHSO_3 vod., zahřívát (76 %); **h)** NaIO_4 , THF vod., rt (95 %); **i)** TMSI, MeCN, $-10\text{ }^\circ\text{C}$ 2 h (99 %)

LDA); vznikl (–)-kodein (**86**) v 57% výtěžku.

Kruhotvorným stupněm v syntéze 2,3,6-trisubstituovaného piperidinového alkaloidu (–)-kassinu⁹⁰ je cyklizace allylalkoholu katalyzovaná PdCl_2 ; arenchromový komplex byl využit v syntéze axiálně-centrálně chirálního 1-naftyltetrahydroisochinolinového alkaloidu (–)-korupensaminu A⁹¹ (pro jiné přístupy k metabolitům tohoto typu viz⁹²). Výstavba spirocyklického systému ve formální syntéze (±)-perhydrohistrioxinu⁹³ je iniciována *ipso*-adici benzylaminu na výrazně elektrofilní komplex železa.

Kruhotvorná metatéza (ring-closing metathesis, RCM; R⁹⁴) se stala významnou metodou konstrukce nenasycených cyklů (viz již předchozí kapitola). Bylo jí užito např. v syntéze (+)-(*R*)-muskopyridinu⁹⁵ a (±)-dihydro-

korynantheolu⁹⁶, metatetická transformace 1-(allylamino)-cyklopent-2-enu na 3-pyrrolin (až 98% výtěžek) je klíčovým krokem v syntéze (–)-swainsoninu⁹⁷. Vysoce diastereoselektivní kruhotvorné metatézy bylo využito japonskými autory⁹⁸ v enantioselektivní syntéze (–)-aspidosperminu (**93**), Schéma 14. Sharplessova epoxidace allylového alkoholu **88** poskytla oxiran **89** (92 %), který byl konvertován v alkohol **90a** (91 %). Protože výsledky v následujícím stupni s alkoholem **90a** byly problematické, tento byl silylován ($\rightarrow$ **90b**) před klíčovou kruhotvornou metatézou. Grubbsův rutheniový komplex 1. generace indukoval kvantitativní a vysoce diastereoselektivní tvorbu (87:13) cyklohexenového kruhu. Cyklohexen **91** (87 %!) byl transformován v laktam **92** s využitím vysoce diastereoselektiv-

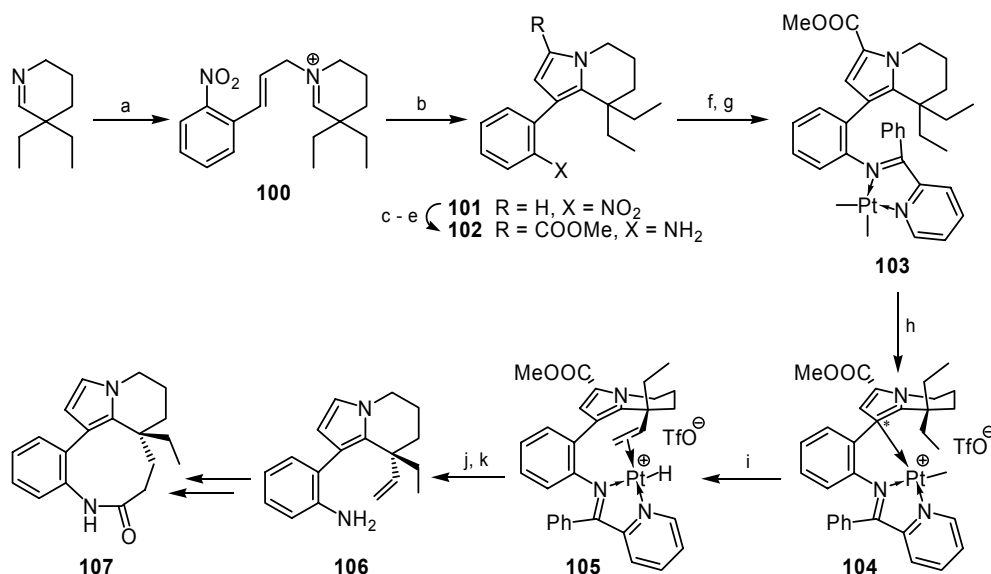


Schéma 16. Syntéza (±)-rhazinilamu s využitím aktivace C-H vazby

Činidla a podmínky: **a**) 2-nitrocinnamylbromid, DMF, 80 °C 15 min (90 %); **b**) Ag_2CO_3 (2 ekv.), PhMe nebo xyleny, rfl 45 min (65–70 %/1 až 5 mmol; 51 %/22 mmol); **c**) Cl_3CCOCl ; **d**) NaOMe, MeOH; **e**) H_2 (1 atm), Pd/C (88 % 3 stupně); **f**) 2-(PhCO) $\text{C}_5\text{H}_4\text{N}$ (1,5 ekv.), TsOH (kat.), PhMe, rfl 30 h (83 %); **g**) $[\text{PtMe}_2(\mu\text{-SMe}_2)]_2$ (0,5 ekv.), PhMe, rt 18 h (88 %); **h**) TfOH, CH_2Cl_2 , –40 °C 15 min; **i**) $\text{F}_3\text{CCH}_2\text{OH}$, 70 °C 72 h (90 % dle NMR); **j**) KCN, CH_2Cl_2 , voda, rt 30 h; **k**) $\text{HONH}_2\cdot\text{HCl}$, NaOAc, MeOH, rt 30 min (60 % z **103**)

ní Michaelovy adice (72 %), a posléze v (–)-**93** Fischero-
vou indolizací.

Rovněž enyny se uplatňují v kruhotvorné metatézě; produkt si potom zachová všechny uhlíky výchozí látky, čehož je možno využít v syntetickém plánu, jak ukazuje např. syntéza alkaloidu (+)-anatoxinu **A** (**99**) z D-methylpyroglutamátu (**94**) v celkovém 27% výtěžku⁹⁹, Schéma 15. Cyklizace/redukce ketonu **95** trifenylsilanem v přítomnosti $\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$ vedla k *cis*-2,5-disubstituovanému pyrrolidinu **96** s vysokou diastereoselektivitou (11:1) a v 99% výtěžku. Odvozený enyn **97** poskytl působením Grubbsova komplexu 2. generace produkt se skeletem anatoxinu **98** (87 %), jehož propen-2-yllová skupina byla posléze konvertována v acetyl cílového alkaloidu. Variace postupu s využitím Wackerovy oxidace byla užita v syntéze strukturně příbuzného (+)-ferrugininu¹⁰⁰.

V závěru této kapitoly není možno nezmínit Johnsonovu a Samešovu syntézu racemického rhazinilamu (**107**)¹⁰¹, spíše významného artefaktu než přirozeného indolového alkaloidu, která je založena na aktivaci vazby C-H neaktivované alkylové skupiny, problému, který dosud v organické syntéze nebyl uspokojivě vyřešen (R^{102}), Schéma 16. V tomto případě byl aktivující komplex vystaven na anilinovém dusíku, který byl posléze zabudován do molekuly cílové sloučeniny. Iminiová sůl **100** byla cyklizována/aromatizována působením uhličitánu stříbrného, a získaný pyrrol **101** (51–70 %) byl po stabilizaci methoxykarbonylovou skupinou konvertován v anilin **102** (88 %). Jeho kondenzací s fenyl(2-pyridyl)ketonem získaný imin poskytl interakci s platínovým komplexem $[\text{PtMe}_2(\mu\text{-SMe}_2)]_2$ komplex **103** (73 %), transformovaný

působením kyseliny trifluormethansulfonové za ztráty methanu v sůl **104**. V ní existuje dativní vazba mezi platínou a pyrrolovým uhlíkem C^* , který tak má spíše sp^3 charakter. Při následující termolýze došlo, za současné ztráty dalšího methanu, k aktivaci jedné (vhodně prostorově orientované) ethylové skupiny doprovázené β -eliminací hydridu za vzniku hydridového komplexu **105** (90 % z **94**). Z něj uvolněný anilin **106** (celkem 60 % z **103**) byl transformován konvenčními prostředky v (±)-**107**. Později autoři zveřejnili enantioselektivní variantu procesu, v níž (–)-rhazinilam (**107**) byl syntetizován s využitím chirálních platínových komplexů typu **103** odvozených od opticky aktivních výchozích ketonů¹⁰³.

Z těžé laboratoře pochází elegantní syntéza modelového tetraacyklu k alkaloidu teleocidinu B-4¹⁰⁴, která je založena na opakované aktivaci methylů *terc*-butylové skupiny v Schiffově basi, připravené z 2-*t*-butyl-5-methoxyanilinu, prostřednictvím tvorby palladacyklů působením chloridu palladnatého.

4. Další metody

Vmezeření dusíku do uhlíkatého skeletu představuje užitečnou metodu tvorby dusíkatých heterocyklů (R^{105}), která je zde ilustrována enantioselektivní syntézou¹⁰⁶ méně rozšířeného (+)-enantiomeru sparteinu (**117**), Schéma 17. C_2 -symetrický (+)-diketon **108**, přístupný z norbornadienu s využitím asymetrické bis-hydrosilylace, byl přes enon **109** konvertován v azidoketon **110**, který intramolekulární *Schmidtovou reakcí* (R^{107}) iniciovanou chloridem titaniči-

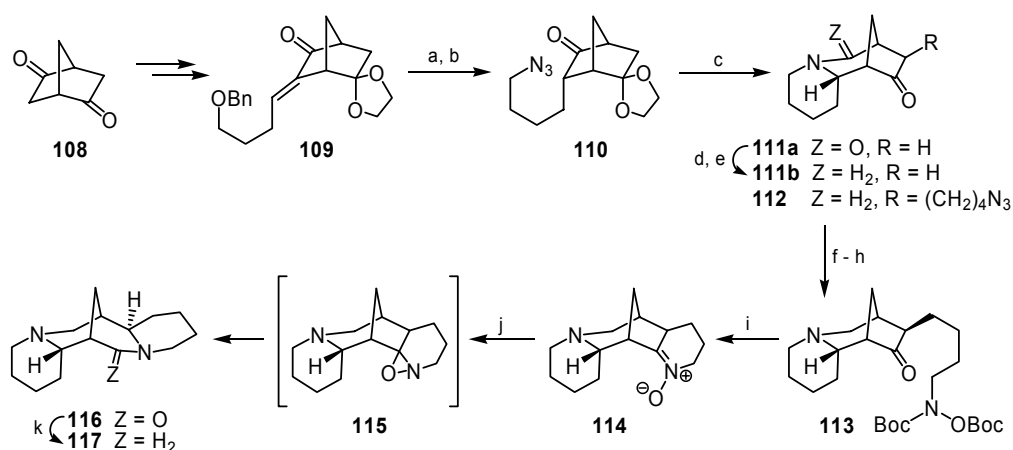


Schéma 17. Syntéza (+)-sparteinu

Činidla a podmínky: **a)** H₂, Pd/C, Pd(OH)₂; **b)** Zn(N₃)₂·2py, DEAD, Ph₃P (78 % 2 stupně); **c)** TiCl₄ (62 %); **d)** Lawessonovo činidlo; **e)** Raneyův nikl; **f)** 111b, I(CH₂)₄Cl, LDA; **g)** NaI, Me₂CO (76 % 4 stupně); **h)** Boc-NH-OBoc, K₂CO₃, DMF (95 %); **i)** TFA, 4 Å MS, potom NaHCO₃ (74–98 %); **j)** hν (254 nm), PhH (76 %); **k)** LiAlH₄, THF, rfl (95 %)

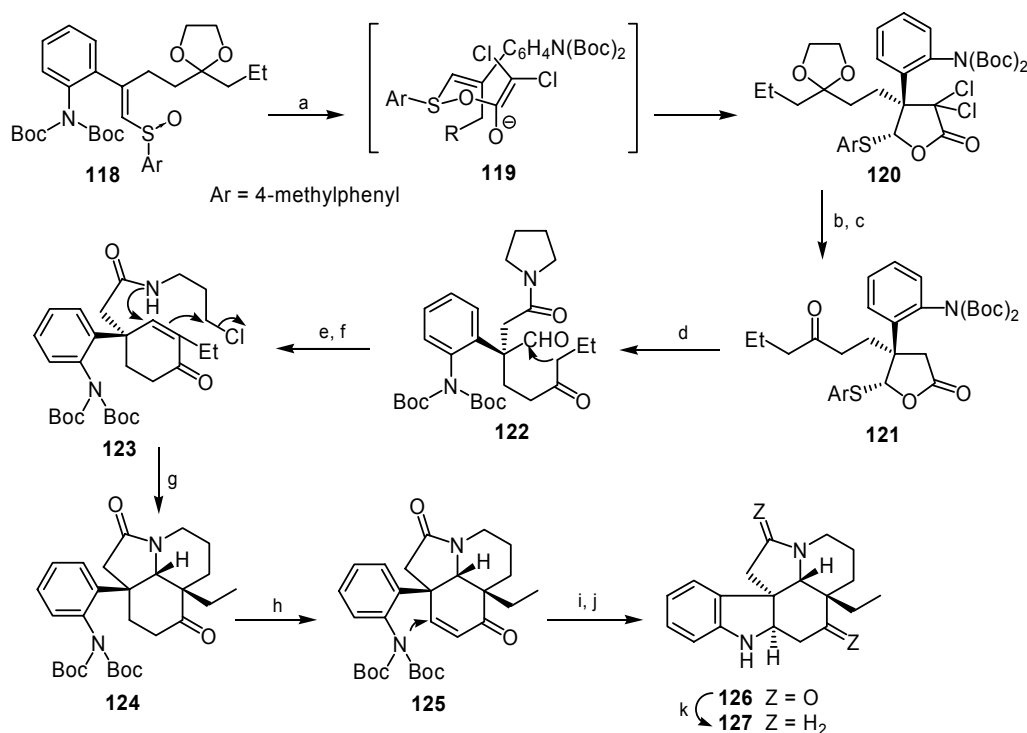


Schéma 18. Syntéza (+)-aspidospermidinu

Činidla a podmínky: **a)** Zn(Cu) (20 ekv.), Cl₃C·COCl, THF, –40 °C 15 min (78 %); **b)** n-Bu₃SnH (2,3 ekv.), Et₃B (0,3 ekv.), PhH, 78 °C 15 h (92 %); **c)** TsOH (kat.), Me₂CO, rt přes noc (96 %); **d)** Pyrrolidin, PhH, rt 12 h (86 %); **e)** Pyrrolidin, *i*-PrOH, 33% AcOH vod., rt 24 h; **f)** *i*-BuOCOCl, Et₃N, THF, 0 °C 5 min, potom ClCH₂CH₂CH₂NH₂·HCl, Et₃N, DMF, 0 °C → rt 30 min (61 %, 2 stupně); **g)** NaH, DMF, 0 °C 1 h (86 %); **h)** KHMDS (2,2 ekv.), THF, –78 °C 1 h, potom TMSCl, –78 °C 1 h, potom odpařit; potom O₂, Pd(OAc)₂, DMSO, 70–75 °C 16 h (80 %); **i)** 3 M-HCl vod./i-PrOH (1:1), rfl 40 min (96 %); **j)** N₂H₄·H₂O, Na, HOCH₂CH₂OH, 160 °C 1 h → 190 °C 1 h → 210 °C 3 h (75 %); **k)** LiAlH₄, THF, rfl 3 h (90 %)

tým poskytl laktam **111a** v 62% výtěžku. Protože analogický uzávěr kruhu v azidoketonu **112** selhal, pravděpodobně v důsledku přednostní komplexace Lewisovy kyseliny

basickým dusíkem, byla base **111b** transformována v chráněný hydroxylamin **113**; cyklokondenzující po odchránění za vzniku nitronu **114**. Ten podlehl při ozáření

Beckmannovu přesmyku, a poskytl přes oxaziridin **115** očekávaný laktam **116** v 76% výtěžku. Schmidtova reakce našla uplatnění i při konstrukci skeletu indolizinového alkaloidu 251F¹⁰⁸ a (+)-aspidospermidinu¹⁰⁹. Vysoké regio-selektivity Beckmannova přesmyku *O*-sulfonátů oximů, iniciovaného organohlinitými činidly, bylo využito např. v syntéze pumiliotoxinu C¹¹⁰ a muskopyridinu¹¹¹.

Vmezeření aminoalkylu do existujícího kruhu (aktivované ketony, laktamy) je užitečná metoda syntézy alkaloidů se středními a velkými kruhy (R¹¹²); za jistých podmínek se proces může opakovat (zipová reakce). Postup našel uplatnění např. v syntéze C₂-symetrického (–)-homalinu¹¹³, celacinninu¹¹⁴ a dalších alkaloidů¹¹⁵. Pomocí příbuzného procesu, tzv. zkřížené (criss-cross) anelace, byl konstruován skelet indolizidinových alkaloidů¹¹⁶.

S přesmyky se již čtenář mohl setkat v článku věnovaném Mannichově a příbuzným reakcím¹. Claisenův přesmyk (R¹¹⁷) hrál klíčovou roli ve stereoselektivní syntéze pyrrolizidinového alkaloidu turneforcidinu z pyrrolidin-3-onu¹¹⁸. V syntéze (+)-aspidospermidinu (**127**) využil¹¹⁹ Marino se spolupracovníky transferu chiralit ze síry na uhlík během [3,3]-sigmatropního přesmyku k výstavbě laktanu **120**, Schéma 18. Reakcí (*E,R*_S)-alkenylsulfoxidu **118** s trichloracetylchloridem a slitinou Zn/Cu byl při –45 °C získán, přes transitní stav **119**, dichlorlaktan **120** jako jediný stereoisomer (78 %). Odvozený laktan **121** poskytl

působením pyrrolidinu dioxosloučeninu **122**, která aldolisovala za vzniku enonu a byla konvertována v **123**. V následující výstavbě pentacyclického skeletu byla opakovaně použita vysoce stereoselektivní Michaelova adice: Nejprve byl basicky indukovaná tandemová adicí/alkylací připraven lilolidindion **124** (86 %), který, po konverzi v enon **125**, podlehl kyselé iniciované Michaelově adici za vzniku 5,16-dioxoaspidospermidinu (**126**) v 96% výtěžku; přesmyk se uplatnil i v syntéze (–)-fysostigminu¹²⁰.

Již zmíněná Michaelova adice je široce využívána v syntéze alkaloidů (R¹²¹). Kombinace asymetrické Birchovy redukce (R¹²²) a alkylatione *in situ* představuje efektivní cestu k chirálním cyklohexenonům¹²³, jejichž Michaelova adice se uplatnila např. v syntéze indolových alkaloidů aspido-permanového¹²³ a eburnanového typu^{123,124}. Elegantní syntéza tropinonu (58 %) je založena na oxidaci cykloheptanolu na cykloheptadienon pomocí IBX (4 ekv.) a následné tandemové Michaelově adici methylaminu¹²⁵; srovnej s cit.¹²⁶.

Enantioselektivní syntéza (–)-cylindricinu C (**134**) Molandera a Ronna¹²⁷ je pěkným příkladem využití dominové intramolekulární Michaelovy adice *N*-nukleofilu v syntéze alkaloidů, Schéma 19. Vinyltriflát **128** byl podroben Stilleho karbonylativnímu kaplinku (Pd kat.) a získaný dienon **129** (79 %) byl nejprve konvertován

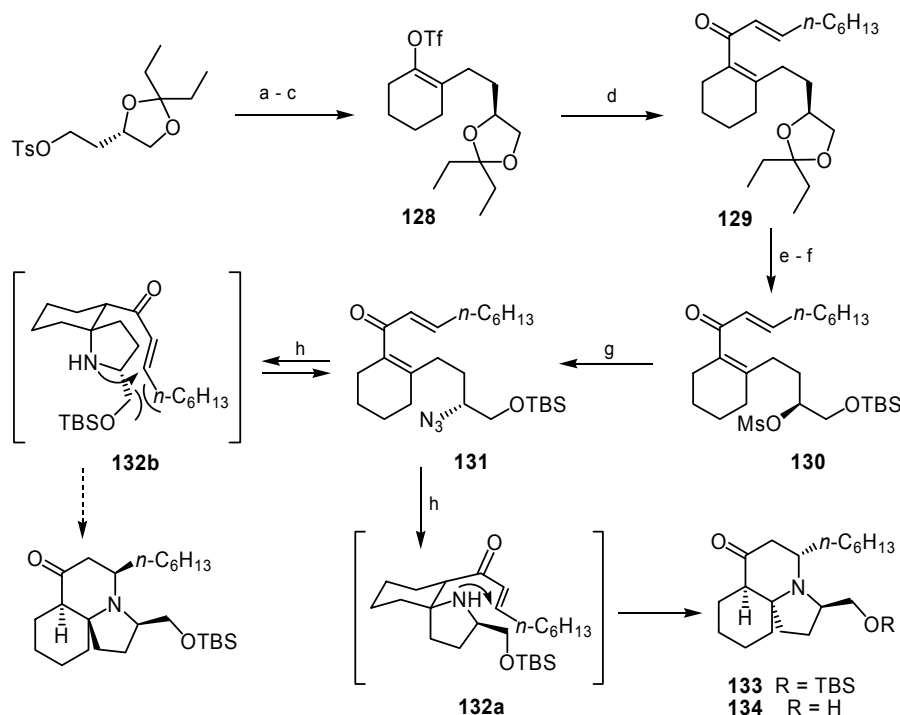


Schéma 19. Syntéza (–)-cylindricinu C

Činidla a podmínky: **a)** Dimethylhydrazon cyklohexanonu, LDA, THF, 0 °C 1 h, potom tosylát, 3 h, potom Cu(OAc)₂, THF vod., 1 h (77 %); **b)** *i*-Pr₂NMgBr, Et₂O, 15 min, potom TMSCl (3 ekv.), Et₃N (3,3 ekv.), HMPA (0,5 ekv.), 20 h; **c)** MeLi, THF, Et₂O, 0 °C 30 min, potom PhNTf₂, TMEDA, 0 °C 30min (86 % 2 stupně); **d)** Trimethyl-(1-(*E*)-oktenyl)stannan, [Pd(PPh₃)₄] (5,5 mol%), LiCl (2,5 ekv.), CO (g), THF, rt 55 °C 48 h (79 %); **e)** [PdCl₂(MeCN)₂] (5 mol%), MeCN vod. (9:1), rt 20 h (83 %); **f)** TBDMSCl, Et₃N, DMAP (kat.), CH₂Cl₂, rt 6 h, potom MsCl, Et₃N, rt 3 h (kvant.); **g)** NaN₃, DMSO, 60 °C 20 h (86 %); **h)** CrCl₂ (15,5 ekv.), THF, rt 1 h (45 %)

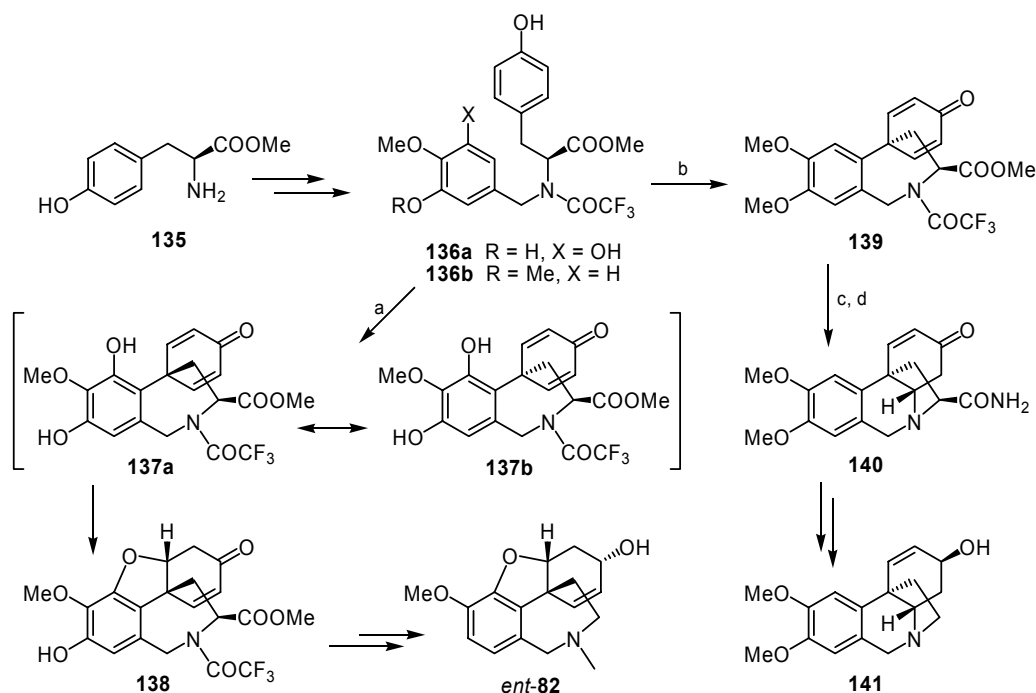


Schéma 20. Oxidativní kaplink fenolů v biomimetické syntéze amarylkovitých alkaloidů

Činidla a podmínky: a) $[\text{Mn}(\text{acac})_3]$ (4 ekv.), MeCN, rft 2,5 h (49 %); b) $\text{Ti}(\text{OCOCF}_3)_3$ (3 ekv.), TFA, MeCN (0,001 M), -23°C 3 h $\rightarrow$ 25°C 21 h (66,5 %); c) NH_3 (g), MeOH, 0°C 6 h (78,5 %); d) NaOH, MeOH vod., $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{rt}$ 2,5 h (40,5 %)

v diol působením Pd^{2+} (83 %), a přes odvozený mesylát **130** nakonec v (+)-azid **131** (86 % celkem). Při redukcí azidu se nejvíce osvědčil CrCl_2 ; získaný amin podlehl okamžité, v principu reverzibilní, Michaelově adici za vzniku spirocyklických intermediátů **132**. Protože druhé Michaelově adici v **132b** brání velké sterické interakce, je výhradním produktem tricyklický keton **133**, z něhož je připraven (–)-cylindricin C (**134**) v celkovém 45% výtěžku z azidu **131**. V klíčovém stupni tak byly vytvořeny dva kruhy a indukována žádaná konfigurace tří vznikajících chirálních center.

Tandemová Michaelova adice amoniaku byla kruhotvorným procesem v alternativní syntéze racemických cylindricinů¹²⁸. Pomocí obdobného procesu s guanidinem byl vybudován pentacyklický skelet ptilomykalinu A¹²⁹; viz rovněž R¹³⁰ o přírodních guanidínech. Dosud nejefektivnější Riceův¹³¹ přístup k totální syntéze morfinu (R¹³²) je založen na kyselé katalyzované intramolekulární adici arylu na 3-cyklohexen-1-on generovaný Birchovou redukcí (Grewého cyklizace); nejedná se tedy o Michaelovu adici na isomerní konjugovaný keton.

Biomimetický přístup k syntéze amarylkovitých alkaloidů (R¹³³) (+)-maritidinu (**141**)¹³⁴ a nepřírodního (+)-galantaminu (ent-**82**)¹³⁵ z L-tyrosinu (**135**) je založen na kaskádě již zmíněného oxidativního kaplinku fenolů norbelladinového typu (R¹³⁶) a následné Michaelově adici N-, resp. O-nukleofilu, Schéma 20. *p,o'*-Kaplink v bis-

fenolu **136a** indukovaný $[\text{Mn}(\text{acac})_3]$ vedl k tvorbě dienu **137**, který podlehl spontánní Michaelově adici výhradně přes **137a** za vzniku enonu **138** ve výtěžku 49 %. Naproti tomu *p,p'*-kaplinkem v monofenolu **136b** pomocí $\text{Ti}(\text{OCOCF}_3)_3$ byl generován dienon **139** (až 66,5 %), z něhož byl po ochráněním dusíku stereoselektivní Michaelovou adicí získán enon **140** (40,5 %). Pověšněte si rozdílného stereochemického výsledku heteroadice ve **137** a **139** (N-COCF₃ $\rightarrow$ NH), který je důsledkem asymetrické indukce přítomným chirálním centrem (sterické vlivy). Poznamenejme, že regioselektivitu kaplinku fenolů je možno ovlivnit tvorbou palladiového komplexu norbelladinového intermediátu, jak dokumentuje syntéza (±)-narwedinu¹³⁷; srovnej s cit.⁸⁹, v níž byla nežádoucí poloha před kaplinkem blokována bromem.

Radikálové procesy nabývají na významu v totálních syntézách¹³⁸. Ilustrací zde uvedenou je tandemová radikálová cyklizace užitá ve formální totální syntéze (±)-morfinu (**78**)¹³⁹, Schéma 21. Bromid **144** byl připraven z fenolu **142** a alkoholu (±)-**143** Mitsunobuho (R¹⁴⁰) reakcí (83 %; opticky aktivní **143** je dostupný chemoenzymaticky (R¹⁴¹) z fenethylbromidu ve 4 stupních). Radikálový proces byl iniciován $\text{Bu}_3\text{SnH/AIBN}$; radikálová kaskádová cyklizace (**145a** $\rightarrow$ **145b** $\rightarrow$ **145c**) byla zakončena eliminací a tetracyklický sulfonamid **146a** byl izolován v 35% výtěžku. Následující adice na styrenovou dvojnou vazbu působením Li/*t*-BuOH, probíhající přes radikál (nebo ani-

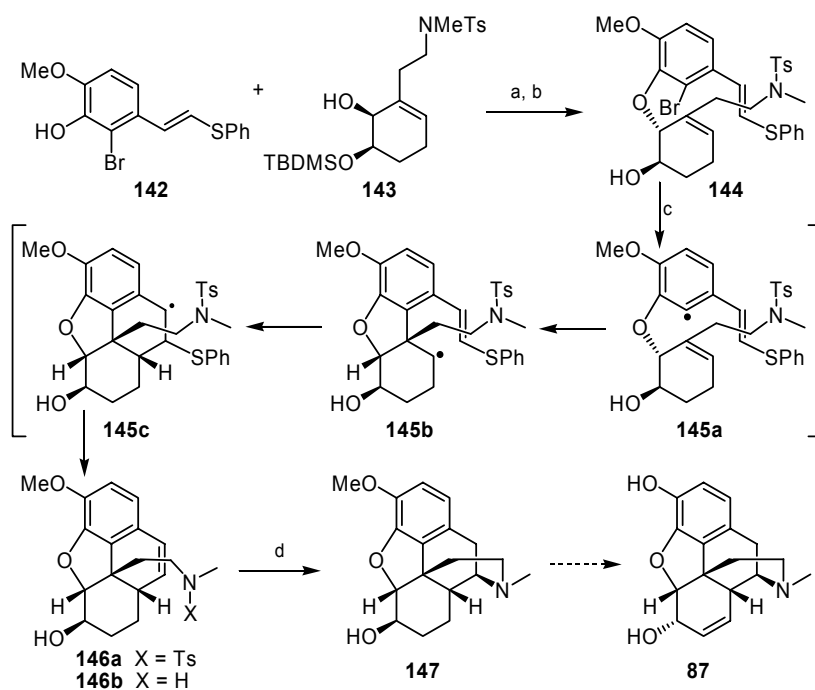


Schéma 21. Formální syntéza (±)-morfinu

Činidla a podmínky: **a)** DEAD, Bu₃P, THF, 0 °C (83 %); **b)** 10% HF/MeCN (98 %); **c)** Bu₃SnH, AIBN, PhH (zatav. zkumavka), 130 °C 35 h (35 %); **d)** Li, *t*-BuOH, NH₃ (l), THF, -78 °C 10 min (85 %)

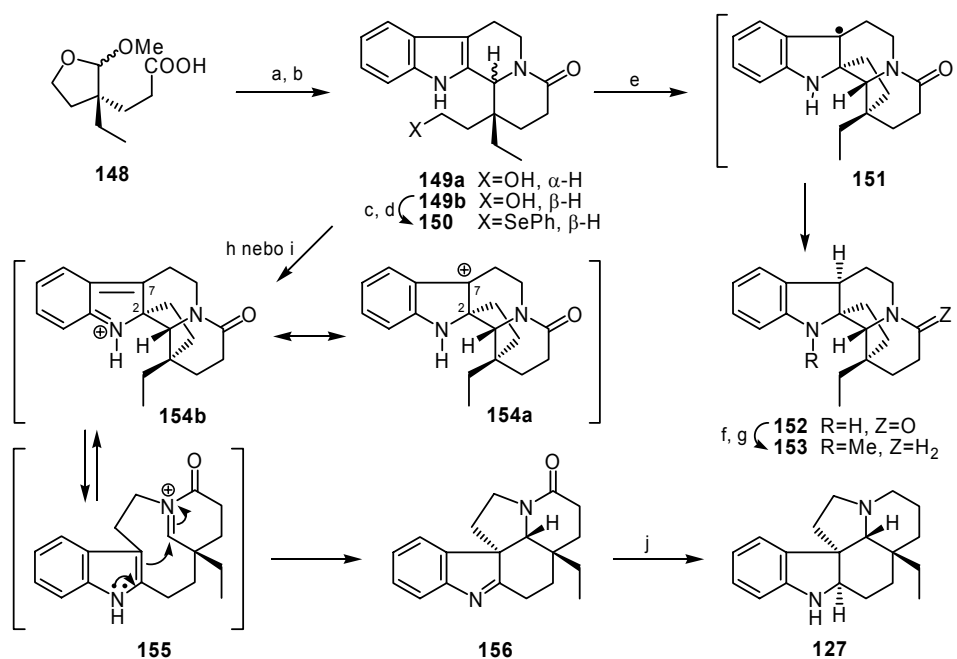


Schéma 22. Radikálová syntéza (-)-vallesamidinu (153) a syntéza (±)-aspidospermidinu (127) z téhož intermediátu

Činidla a podmínky: **a)** Tryptamin, AcOH, 125 °C 6 d (43 % + 44 %); **b)** 20% NaOH vod., MeOH, rt 1 h ((+)-149b 72 %, (-)-149a 85 %); **c)** MsCl, DMAP, py, 0 °C 2 h (92 %); **d)** (PhSe)₂, NaBH₄, EtOH, 0 °C → rt 3 h (68 %); **e)** *n*-Bu₃SnH, AIBN, PhMe, 100 °C 0,5 h (91 %); **f)** 35% CH₂O vod., NaBH₃CN, MeCN, potom AcOH, rt 1 h (87 %); **g)** LiAlH₄, THF, 70 °C 0,5 h (82 %); **h)** (±)-149, 40% H₂SO₄, 100 °C; **i)** (±)-149, BF₃·OEt₂, 100 °C; **j)** LiAlH₄ (20–25 % z tryptaminu)

on) aminu **146b**, dokončila výstavbu skeletu morfinanových alkaloidů (83 %); srovnej s cyklizací **85** → **86** ze Schématu 13. Oxidací dihydroisokodeinu (**147**) na 7,8-dihydrokodeinon (Swern) byla dokončena formální syntéza ($\pm$)-**87**; pro další radikálové přístupy k morfinanům viz cit.¹⁴². Radikálově byl uzavírán rovněž skelet aspidospermanových basí¹⁴³ (aplikace u indolových alkaloidů viz v R¹⁴⁴). Radikálových cyklizací bylo opakovaně užito i v totální syntéze ($\pm$)-gelseminu¹⁴⁵.

Na radikálové adici do polohy C-2 indolu je založena i *de novo* syntéza sekoschizozyanového alkaloidu (–)-vallesamidinu (**153**)¹⁴⁶, Schéma 22. Mnohastupňovou syntézou přístupná acetal-kyselina **148** byla nestereoselektivní Pictetovou-Spenglerovou kondensací s tryptaminem konvertována v ekvimolární směs acetátů, které byly odděleně hydrolyzovány v hydroxylaktamy **149**. Stereoisomer (+)-**149b** (31,2 %) byl po převedení v selenid (+)-**150** cyklizován působením Bu₃SnH v přítomnosti AIBN: Atakem primárně vzniklého radikálu v poloze C-2 indolového jádra byl generován pentacyklický radikál **151**, který vedl k tvorbě laktamu (+)-**152** v 91% výtěžku! Úspěch přístupu

souvisí s dostačující stabilitou benzylového radikálu **151**. V této souvislosti je užitečné zmínit Harley-Masonovu klasickou syntézu¹⁴⁷ ($\pm$)-aspidospermidinu (**127**), která je založena na iontové variantě procesu, Schéma 22. V tomto případě racemický alkohol **149** cyklizoval působením jak Lewisovy (BF₃), tak Brønstedovy kyseliny (H₂SO₄) za vzniku karbokationtu **154a**, spíše však konjugovaného iminia **154b**, které bylo v rovnováze s iminiem **155**, stabilizujícím se alternativní cyklizací za vzniku indoleninu **156** (viz rovněž cit.¹⁴⁸).

5. Syntéza alkaloidů na přelomu století. Výhled

Totální syntéza alkaloidů se ve stále větší míře zaměřuje na enantioselektivní procesy a široké používání chirálních katalyzátorů. Přesto mohou být i syntézy racematů v případech komplexních látek velkým úspěchem, viz např. gelsemin¹⁴⁹. Cílem je novost a maximální efektivnost z hlediska počtu stupňů a výtěžků.

Existují v zásadě dva důvody pro totální syntézu alka-

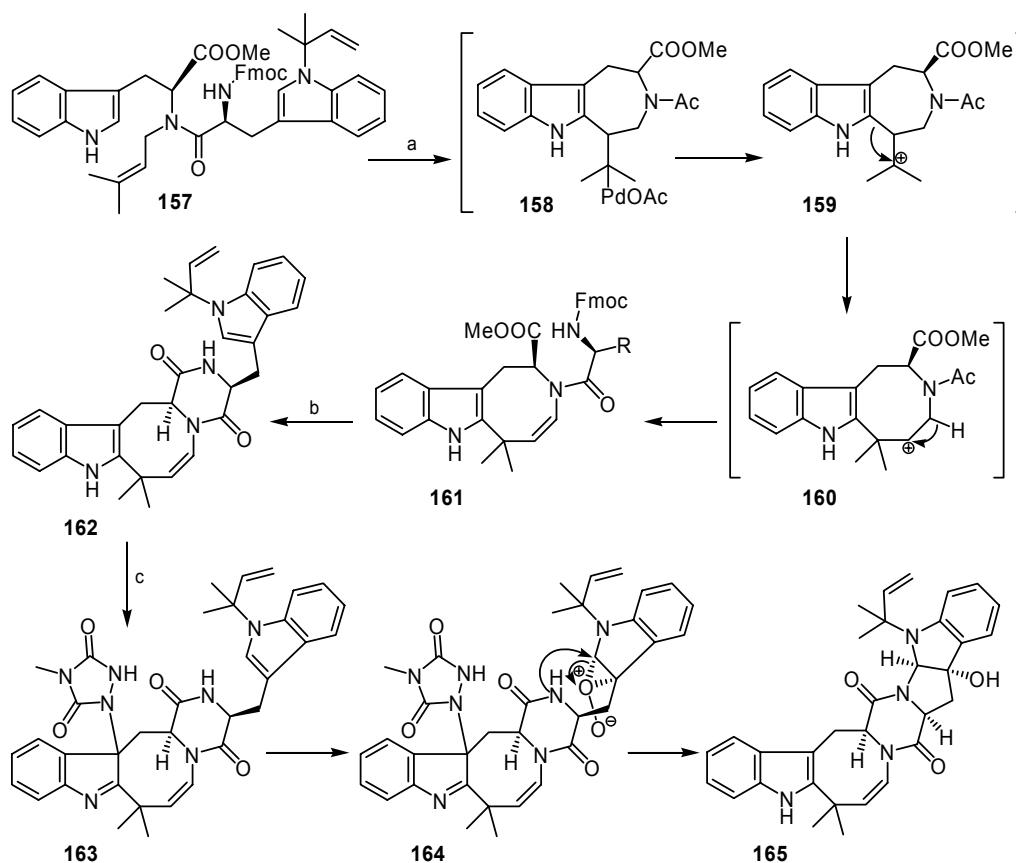


Schéma 23. Syntéza (+)-okaraminu N

Činidla a podmínky: **a**) Pd(OAc)₂ (1 ekv.), O₂, AcOH/dioxan/voda (1:3,5:1), 23 °C 16 h (38 %; 44 % brsm); **b**) Et₃NH (přebytek), THF, 0 °C → 23 °C (2 h) 4 h (95 %); **c**) MTAD, CH₂Cl₂, –5 °C 10 min, potom odpařit, potom O₂, sluneční lampa, methylenová modř, MeOH, –28 °C 7,5 h, potom Me₂S, MeOH, –28 °C → –10 °C (3 h), potom odpařit a 110 °C 30 min (36 %; 70 % brsm)

loidů (a přírodních látek obecně):

- a) akademický – vědecká prestiž laboratoře/týmu. Syntéza může být nezbytná i pro potvrzení struktury odvozené pomocí metod strukturní analýzy (R¹⁵⁰), viz příklad revize struktur lepadiforminu¹⁵¹ a batzelladinu F¹⁵²,
- b) praktický – využitelnost biologických účinků při nedostačující kapacitě přírodních zdrojů. Syntéza analogů pro optimalizaci účinnosti. Potenciální výroba¹⁵³.

Stav, v němž se syntéza alkaloidů na počátku tisíciletí nachází, názorně ilustrují dvě Nicolaouovy^{154,155} a Harranova¹⁵⁶ totální syntéza diazonamidu A. Totální syntéza (+)-plikaminu (Ley¹⁵⁷) dokumentuje efektivitu použití činidel zakotvených na pevné fázi (R¹⁵⁸). Čtvrtstoletí muselo uplynout od klasické Uskokovićovy syntézy chininu¹⁵⁹, než bylo nedávno zveřejněno pět enantioselektivních syntéz tohoto alkaloidu^{160–164} (viz rovněž¹ a R^{165,166}). Organická syntéza a totální syntéza se navzájem obohacují¹⁶⁷, jak jasně dokazuje brilantní syntéza (+)-okaraminu N (**165**), zveřejněná předloni Coreyem se spolupracovníky¹⁶⁸ (viz rovněž³), Schéma 23. V amidu **157**, přístupném z derivátů tryptofanu a 3-methyl-2-butenalu „one-pot“ způsobem v 70% výtěžku, byl vytvořen azocinový kruh působením octanu palladnatého v kyslíkové atmosféře. Pouze nesubstituovaný indol se účastnil reakce, probíhající přes palladiový komplex **158** a azepiniový kation **159**, který přesmykl na azociniový kation **160**, stabilizující se za vzniku **161** v 44% výtěžku (byla detegována pouze stopová množství isomerního azepinu, vznikajícího ze **158** alternativním způsobem). Následující tvorba diketopiperazinu **162** (95 %) byla indukována přebytkem diethylaminu. Diferenciace indolových jader, nezbytné pro dokončení syntézy, bylo dosaženo ochranou *N*-nesubstituovaného indolu pomocí enové reakce s *N*-methyltriazolindionem. Generovaný indolenin-indol **163** byl podroben fotosensitizované oxidaci/cyklizaci, probíhající s diastereoselektivitou cca 5:1 patrně přes *O*-oxiraniumoxid **164**. Následná redukce dimethylsulfidem a závěrečná termolytická regenerace indolu (retro-enová reakce) dokončily syntézu okaraminu A (**165**), který byl izolován ve výtěžku 70 % z piperazinu **162** (syntézu příbuzného austamidu viz v cit.¹⁶⁹).

Tato elegantní syntéza dokumentuje, že umění, krása a chemická logika jsou nedílnými součástmi současné syntézy alkaloidů a dusíkatých heterocyklických sloučenin obecně; zároveň naznačuje směr, kterým se bude ubírat další vývoj totální syntézy stále složitějších přírodních látek^{3,170,171}.

LITERATURA

1. Hájiček J.: Chem. Listy 98, 1096 (2004).
2. Nicolaou K. C., Sorensen E. J.: *Classics in Total Synthesis*. VCH, Weinheim, 1996.
3. Nicolaou K. C., Snyder S. A.: *Classics in Total Synthesis II*. Wiley-VCH, Weinheim, 2003.
4. Nicolaou K. C., Snyder S. A., Montagnon T., Vassilikogiannakis G.: Angew. Chem. Int. Ed. 41, 1668

- (2002).
5. Wender P. A., Schaus J. M., White A.W.: J. Am. Chem. Soc. 102, 6157 (1980).
6. White J. D., Choi Y.: Helv. Chim. Acta 85, 4306 (2002).
7. Kishi Y., Aratani M., Fukuyama T., Nakatsubo F., Goto T., Inoue S., Sugiura S., Kakoi H.: J. Am. Chem. Soc. 94, 9217 (1972).
8. Kozmin S. A., Iwama T., Huang Y., Rawal V. H.: J. Am. Chem. Soc. 124, 4628 (2002).
9. Kozmin S. A., Rawal V. H.: J. Am. Chem. Soc. 120, 13523 (1998).
10. Iyengar R., Schildknecht K., Aubé J.: Org. Lett. 2, 1625 (2000).
11. Rahman A.-u., Basha A.: *Biosynthesis of Indole Alkaloids*. Clarendon Press, Oxford, 1983.
12. *The Monoterpenoid Indole Alkaloids* (Indoles, Part 4). (Saxton J. E., ed.). John Wiley, New York 1984.
13. *Monoterpenoid Indole Alkaloids* (Indoles, Supplement to Part 4). (Saxton J. E., ed.). John Wiley, Chichester 1994.
14. Kuehne M. E., Seaton P. J.: J. Org. Chem. 50, 4790 (1985).
15. Kuehne M. E., Podhorez D. E., Mulamba T., Bornmann W. G.: J. Org. Chem. 52, 347 (1987).
16. Kuehne M. E., Kirkemo C. L., Matsko T. H., Bohnert J. C.: J. Org. Chem. 45, 3259 (1980).
17. Kuehne M. E., Bornmann W. G., Earley W. G., Marko I.: J. Org. Chem. 51, 2913 (1986).
18. Bornmann W. G., Kuehne M. E.: J. Org. Chem. 57, 1752 (1992).
19. Kuehne M. E., Frasier D. A., Spitzer T. D.: J. Org. Chem. 56, 2696 (1991).
20. Kuehne M. E., Xu F.: J. Org. Chem. 63, 9427 (1998).
21. Bandarage U. K., Kuehne M. E., Glick S. D.: Tetrahedron 55, 9405 (1999).
22. Kuehne M. E., Wilson T. E., Bandarage U. K., Dai W., Yu Q.: Tetrahedron 57, 2085 (2001).
23. Kuehne M. E., Bornmann W. G.: J. Org. Chem. 56, 513 (1991).
24. Kuehne M. E., Bandarage U. K., Hammach A., Li Y.-L., Wang T.: J. Org. Chem. 63, 2172 (1998).
25. Kuehne M. E., Dai W., Li Y.-L.: J. Org. Chem. 66, 1560 (2001).
26. Kuehne M. E., Xu F.: J. Org. Chem. 63, 9434 (1998).
27. Kalas G., Greiner I., Kaitár-Peredy M., Brlik J., Szabó L., Szántay C.: J. Org. Chem. 58, 1434 (1993).
28. Danieli B., Lesma G., Palmisano G., Passarella D., Silvani A.: Tetrahedron 50, 6941 (1994).
29. Yokoshima S., Ueda T., Kobayashi S., Sato A., Kuboyama T., Tokuyama H., Fukuyama T.: J. Am. Chem. Soc. 124, 2137 (2002).
30. Carroll W. A., Grieco P. A.: J. Am. Chem. Soc. 115, 1164 (1993).
31. Kalas G., Greiner I., Kaitár-Peredy M., Brlik J.,

- Szabó L., Szántay C.: *J. Org. Chem.* **58**, 6076 (1993).
32. Williams R. M., Sanz-Cervera J. F., Sancenón F., Marco J. A., Halligan K. M.: *Bioorg. Med. Chem.* **6**, 1233 (1998).
 33. Sanz-Cervera J. F., Williams R. M.: *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 2556 (2002).
 34. Williams R. M., Cox R. J.: *Acc. Chem. Res.* **36**, 127 (2003).
 35. Martin S. F., Humphrey J. M., Ali A., Hillier M. C.: *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 866 (1999).
 36. Rawal V. H., Iwasa S.: *J. Org. Chem.* **59**, 2685 (1994).
 37. Rawal V. H., Michoud C., Monestel R. F.: *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 3030 (1993).
 38. Marsault E., Toró A., Nowak P., Deslongchamps P.: *Tetrahedron* **57**, 4243 (2001).
 39. Bodwell G. J., Li J.: *Angew. Chem. Int. Ed.* **41**, 3261 (2002).
 40. Bonjoch J., Solé D.: *Chem. Rev.* **100**, 3455 (2000).
 41. Brosius A. D., Overman L. E., Schwink L.: *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 700 (1999).
 42. Boger D. L., Ichikawa S., Jiang H.: *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 12169 (2000).
 43. Ichihara A.: *Synthesis* **1987**, 207.
 44. Oppolzer W., Robbiani C.: *Helv. Chim. Acta* **66**, 1119 (1983).
 45. Segura J. L., Martin N.: *Chem. Rev.* **99**, 3199 (1999).
 46. Behforouz M., Ahmadian M.: *Tetrahedron* **56**, 5259 (2000).
 47. Buonora P., Olsen J.-C., Oh T.: *Tetrahedron* **57**, 6099 (2001).
 48. Abe H., Aoyagi S., Kibayashi C.: *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 4583 (2000).
 49. Abe H., Aoyagi S., Kibayashi C.: *Tetrahedron Lett.* **41**, 1205 (2000).
 50. Denmark S. E., Middleton D. S.: *J. Org. Chem.* **63**, 1604 (1998).
 51. Denmark S. E., Marcin L. R.: *J. Org. Chem.* **62**, 1675 (1997).
 52. Wilkie G. D., Elliott G. I., Blagg B. S. J., Wolkenberg S. E., Soenen D. R., Miller M. M., Pollack S., Boger D. L.: *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 11292 (2002).
 53. *Synthetic Applications of 1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry Toward Heterocycles and Natural Products*. (Padwa A., Pearson W. H., ed.). Wiley, New York 2002.
 54. Broggini G., Zecchi G.: *Synthesis* **1999**, 905.
 55. Tufariello J. J., Mullen G. B., Tegeler J. J., Trybulski E. J., Wong S. C., Ali S. A.: *J. Am. Chem. Soc.* **101**, 2435 (1979).
 56. Gössinger E.: *Monatsh. Chem.* **111**, 143 (1980).
 57. Oppolzer W., Petrzilka M.: *Helv. Chim. Acta* **61**, 2755 (1978).
 58. Williams G. M., Roughley S. D., Davies J. E., Holmes A. B.: *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 4900 (1999).
 59. Snider B. B., Cartaya-Marin C. P.: *J. Org. Chem.* **49**, 1688 (1984).
 60. Werner K. M., De los Santos J. M., Weinreb S. M., Shang M. A.: *J. Org. Chem.* **64**, 686 (1999).
 61. Nagasawa K., Georgieva A., Koshino H., Nakata T., Kita T., Hashimoto Y.: *Org. Lett.* **4**, 177 (2002).
 62. Oinuma H., Dan S., Kakisawa H.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1983**, 654.
 63. Nagasawa K., Georgieva A., Nakata T.: *Tetrahedron* **56**, 187 (2000).
 64. White J. D., Blakemore P. R., Korf E. A., Yokochi A. F. T.: *Org. Lett.* **3**, 413 (2001).
 65. Kozikowski A. P., Chen Y.-Y.: *Tetrahedron* **40**, 2345 (1984).
 66. Hudlický T., Seoane G., Lovelace T. C.: *J. Org. Chem.* **53**, 2094 (1988).
 67. Padwa A., Weingarten M. P.: *Chem. Rev.* **96**, 223 (1996).
 68. Padwa A., Price A. T.: *J. Org. Chem.* **63**, 556 (1998).
 69. Oppolzer W.: *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **23**, 876 (1984).
 70. Keck G. E., Webb R. R.: *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 3173 (1981).
 71. Oppolzer W., Thirring K.: *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 4978 (1982).
 72. Oppolzer W., Robbiani C., Bättig K.: *Tetrahedron* **40**, 1391 (1984).
 73. Parsons A. F.: *Tetrahedron* **52**, 4149 (1996).
 74. *Organometallics in Synthesis*. (Schlosser M., ed.). Wiley, New York 2002.
 75. Tietze L. F., Ila H., Bell H. P.: *Chem. Rev.* **104**, 3453 (2004).
 76. Trost B. M., Crawley M. L.: *Chem. Rev.* **103**, 2921 (2003).
 77. Trost B. M.: *J. Org. Chem.* **69**, 5813 (2004).
 78. Stragies R., Blechert S.: *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 9584 (2000).
 79. Prelog V., Battegay J., Taylor W. I.: *Helv. Chim. Acta* **31**, 2244 (1948).
 80. Overman L. E., Paone D. V., Stearns B. A.: *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 7702 (1999).
 81. Corey E. J., Guzman-Perez A.: *Angew. Chem. Int. Ed.* **37**, 389 (1998).
 82. Overman L. E., Larrow J. F., Stearns B. A., Vance J. M.: *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **39**, 213 (2000).
 83. Link J. T., Overman L. E.: *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 8166 (1996).
 84. Edmonds D. J., Johnston D., Procter D. J.: *Chem. Rev.* **104**, 3371 (2004).
 85. Overman L. E., Peterson E. A.: *Angew. Chem. Int. Ed.* **42**, 2525 (2003).
 86. Lebsack A. D., Link J. T., Overman L. E., Stearns B. A.: *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 9008 (2002).
 87. Trost B. M., Tang W.: *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **41**, 2795 (2002).
 88. Trost B. M., Tang W.: *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 14542 (2002).
 89. Czollner L., Frantsits W., Küenburg B., Hedenig U., Fröhlich J., Jordis U.: *Tetrahedron Lett.* **39**, 2087 (1998).

- (1998).
90. Watanabe T., Shakadou M., Uemura M.: *Synlett* 2000, 1141.
 91. Bringmann G., Breuning M., Tasler S.: *Synthesis* 1999, 525.
 92. Fürstner A.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 39, 3012 (2000).
 93. Pearson A. J., Ham P.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* 1983, 1421.
 94. Deiters A., Martin S. F.: *Chem. Rev.* 104, 2199 (2004).
 95. Hagiwara H., Katsumi T., Kamat V. P., Hoshi T., Suzuki T., Ando M.: *J. Org. Chem.* 65, 7231 (2000).
 96. Deiters A., Martin S. F.: *Org. Lett.* 4, 3243 (2002).
 97. Buschmann N., Rückert A., Blechert S.: *J. Org. Chem.* 67, 4325 (2002).
 98. Fukuda Y.-i., Shindo M., Shishido K.: *Org. Lett.* 5, 749 (2003).
 99. Brenneman J. D., Martin S. F.: *Org. Lett.* 6, 1329 (2004).
 100. Aggarwal V. K., Astle C. J., Rogers-Evans M.: *Org. Lett.* 6, 1469 (2004).
 101. Johnson J. A., Sames D.: *J. Am. Chem. Soc.* 122, 6321 (2000).
 102. Jia C., Kitamura T., Fujiwara Y.: *Acc. Chem. Res.* 34, 633 (2001).
 103. Johnson J. A., Li N., Sames D.: *J. Am. Chem. Soc.* 124, 6900 (2002).
 104. Dangel B. D., Godula K., Youn S. W., Sezen B., Sames D.: *J. Am. Chem. Soc.* 124, 11856 (2002).
 105. Fodor G., Nagubandi S.: *Tetrahedron* 36, 1279 (1980).
 106. Smith B. T., Wendt J. A., Aubé J.: *Org. Lett.* 4, 2577 (2002).
 107. Pearson W. H.: *J. Heterocycl. Chem.* 33, 1489 (1996).
 108. Wroblewski A., Sahasrabudhe K., Aubé J.: *J. Am. Chem. Soc.* 126, 5475 (2004).
 109. Iyengar R., Schildknecht K., Aubé J.: *Org. Lett.* 2, 1625 (2002).
 110. Maruoka K., Miyazaki T., Ando M., Matsumura Y., Sakane S., Hattori K., Yamamoto H.: *J. Am. Chem. Soc.* 105, 2831 (1983).
 111. Sakane S., Matsumura Y., Yamamoto H., Ishida Y., Maruoka K., Yamamoto H.: *J. Am. Chem. Soc.* 105, 672 (1983).
 112. Hesse M.: *Ring Enlargement in Organic Chemistry*. Verlag Chemie, Weinheim 1991.
 113. Wasserman H. H., *Tetrahedron Lett.* 23, 405 (1982).
 114. Wasserman H. H., Robinson R. P., Matsuyama H.: *Tetrahedron Lett.* 21, 3493 (1980).
 115. Bienz S., Guggisberg A., Wälichli R., Hesse M.: *Helv. Chim. Acta* 71, 1708 (1988).
 116. Ohnuma T., Tabe M., Shiiya K., Ban Y., Date T.: *Tetrahedron Lett.* 24, 4249 (1983).
 117. Castro A. M. M.: *Chem. Rev.* 104, 2939 (2004).
 118. Ohsawa T., Ihara M., Fukumoto K., Kametani T.: *J. Org. Chem.* 48, 3644 (1983).
 119. Marino J. P., Rubio M. B., Cao G., de Dios A.: *J. Am. Chem. Soc.* 124, 13398 (2002).
 120. Marino J. P., Bogdan S., Kimura K.: *J. Am. Chem. Soc.* 114, 5566 (1992).
 121. Ihara M., Fukumoto K.: *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 32, 1010 (1993).
 122. Hook J. M., Mander L. N.: *Nat. Prod. Rep.* 3, 35 (1986).
 123. Schultz A. G., Pettus L.: *J. Org. Chem.* 62, 6855 (1997).
 124. Schultz A. G., Malachowski W. P., Pan Y.: *J. Org. Chem.* 62, 1223 (1997).
 125. Nicolaou K. C., Montagnon T., Baran P. S., Zhong Y.-L.: *J. Am. Chem. Soc.* 124, 2245 (2002).
 126. Bottini A. T., Gal J.: *J. Org. Chem.* 36, 1718 (1971).
 127. Molander G. A., Roenn M.: *J. Org. Chem.* 64, 5183 (1999).
 128. Snider B. B., Liu T.: *J. Org. Chem.* 62, 5630 (1997).
 129. Snider B. B., Shi Z.: *J. Am. Chem. Soc.* 116, 549 (1994).
 130. Berlinck R. G. S.: *Nat. Prod. Rep.* 19, 617 (2002).
 131. Rice K. C.: *J. Org. Chem.* 45, 3135 (1980).
 132. Zezula J., Hudlický T.: *Synlett* 2005, 388.
 133. Rinner U., Hudlický T.: *Synlett* 2005, 365.
 134. Yamada S., Tomioka K., Koga K.: *Tetrahedron Lett.* 1976, 57.
 135. Shimizu K., Tomioka K., Koga K., Yamada S.: *Heterocycles* 8, 277 (1977).
 136. Tobinaga S.: *Bioorg. Chem.* 4, 110 (1975).
 137. Holton R. A., Sibi M. P., Murphy W. S.: *J. Am. Chem. Soc.* 110, 314 (1988).
 138. Giese B., Kopping B., Göbel T., Dickhaut J., Thoma G., Kulicke K. J. v *Organic Reactions*. Dtl 48, str. 301, (Paquette L. A., ed.). John Wiley & Sons, New York 1996.
 139. Parker K. A., Fokas D.: *J. Am. Chem. Soc.* 114, 9688 (1992).
 140. Simon C., Hosztafi S., Makleit S.: *J. Heterocycl. Chem.* 34, 349 (1997).
 141. Hudlický T., Gonzalez D., Gibson D. T.: *Aldrichim. Acta* 32, 35 (1999).
 142. Butora G., Hudlický T., Fearnley S. P., Stabile M. R., Gum A. G., Gonzalez D.: *Synthesis* 1998, 665.
 143. Kuehne M. E., Wang T., Seaton P. J.: *J. Org. Chem.* 61, 6001 (1996).
 144. Li J. J. v *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives*. Dtl 15, str. 573. Elsevier Science, 2001.
 145. Atarashi S., Choi J.-K., Ha D.-C., Hart D. J., Kuzmich D., Lee C.-S., Ramesh S., Wu S. C.: *J. Am. Chem. Soc.* 119, 6226 (1997).
 146. Tanino H., Fukuishi K., Ushiyama M., Okada K.: *Tetrahedron Lett.* 43, 2385 (2002).
 147. Harley-Mason J., Kaplan M.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1967, 915.
 148. Andriamialisoa R. Z., Langlois N., Langlois Y.: *J. Org. Chem.* 50, 961 (1985).
 149. Ng F. W., Lin H., Danishefsky S. J.: *J. Am. Chem. Soc.* 124, 9812 (2002).
 150. Nicolaou K. C., Snyder S. A.: *Angew. Chem., Int.*

- Ed. Engl. 44, 1012 (2005).
151. Weinreb S. M.: Acc. Chem. Res. 36, 59 (2003).
 152. Cohen F., Overman L. E.: J. Am. Chem. Soc. 123, 10782 (2001).
 153. Kotha S.: Tetrahedron 50, 3639 (1994).
 154. Nicolaou K. C., Bella M., Chen D. Y.-K., Huang X., Ling T., Snyder S. A.: Angew. Chem., Int. Ed. Engl. 41, 3495 (2002).
 155. Nicolaou K. C., Rao P. B., Hao J., Reddy M. V., Rassias G., Huang X., Chen D. Y.-K., Snyder S. A.: Angew. Chem., Int. Ed. Engl. 42, 1753 (2003).
 156. Burgett A. W. G., Li Q., Wei Q., Harran P. G.: Angew. Chem. Int. Ed. 42, 4961 (2003).
 157. Baxendale I. R., Ley S. V., Piutti C.: Angew. Chem., Int. Ed. Engl. 41, 2194 (2002).
 158. Ley S. V., Baxendale I. R., Bream R. N., Jackson P. S., Leach A. G., Longbottom D. A., Nesi M., Scott J. S., Storer R. I., Taylor S. J.: J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1 2000, 3815.
 159. Gutzwiller J., Uskoković M.: J. Am. Chem. Soc. 100, 576 (1978).
 160. Stork G., Niu D., Fujimoto A., Koft E. R., Balkovec J. M., Tata J. R., Dake G. R.: J. Am. Chem. Soc. 123, 3239 (2001).
 161. Smith B. T., Wendt J. A., Aubé J.: Org. Lett. 4, 2577 (2002).
 162. Raheem I. T., Goodman S. N., Jacobsen E. N.: J. Am. Chem. Soc. 126, 706 (2004).
 163. Igarashi J., Katsukawa M., Wang Y.-G., Acharya H. P., Kobayashi Y.: Tetrahedron Lett. 45, 3783 (2004).
 164. Hermet J.-P. R., McGrath M. J., O'Brien P., Porter D. W., Gilday J.: Chem. Commun. 2004, 1830.
 165. Kaufman T. S., Rúveda E. A.: Angew. Chem., Int. Ed. Engl. 44, 854 (2005).
 166. Hoffmann H. M. R., Frackenpohl J.: Eur. J. Org. Chem. 2004, 4293.
 167. Nicolaou K. C., Baran P. S.: Angew. Chem., Int. Ed. Engl. 41, 2679 (2002).
 168. Baran P. S., Guerrero C. A., Corey E. J.: J. Am. Chem. Soc. 125, 5628 (2003).
 169. Baran P. S., Corey E. J.: J. Am. Chem. Soc. 124, 7904 (2002).
 170. Hall N.: Chem. Commun. 2003, 661.
 171. Corey E. J.: J. Org. Chem. 69, 2917 (2004).

J. Hájíček (*Zentiva/Výzkumný ústav pro farmacii a biochemii, a.s., Prague*): **Trends in Total Synthesis of Alkaloids**

The article deals with implementation of general synthetic reactions in total synthesis of alkaloids. The use of both classical and newly developed synthetic methodologies is illustrated with examples selected from the whole alkaloid kingdom.

OXAZOLIDINOVÉ DERIVÁTY EFEDRINU

MARTINA ASTROVÁ, LADISLAV KURC
a LIBOR ČERVENÝ

Ústav organické technologie, Vysoká škola chemicko-
technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
martina.astrova@vscht.cz, ladislav.kurc@vscht.cz,
libor.cerveny@vscht.cz

Došlo 10.6.04, přijato 25.11.04.

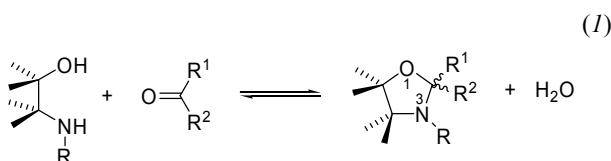
Klíčová slova: oxazolidin, efedrin, kondenzace, hydrolýza

Obsah

1. Úvod
2. Stereochemie vzniku derivátů oxazolidinu
3. Vliv rozpouštědla na stereoselektivitu reakce efedrinu s aromatickými aldehydy
4. Hydrolýza derivátů oxazolidinu
5. Závěr

1. Úvod

Oxazolidin je nasycený pětičlenný heterocyklus s atomem kyslíku v poloze 1 a atomem dusíku v poloze 3. Některé jeho deriváty jsou biologicky aktivními látkami s potenciálním uplatněním ve farmacii. Deriváty 1,3-oxazolidinů vznikají^{1,2} kondenzací β -aminoalkoholů s aldehydy nebo ketony podle (1).



Při nestejných substituentech na jednotlivých uhlíkových atomech oxazolidinu vznikají chirální centra. Může tedy vznikat široká paleta stereoisomerů, jejichž biologická aktivita je značně různorodá. Například deriváty oxazolidinu vznikající z 3-[1-hydroxy-2-(methylamino)ethyl]fenolu se ukázaly jako lokální mydriatika, deriváty oxazolidinů odvozené od efedrinu se osvědčily jako sympatomimetika³⁻⁶. Čtyři stereoisomery efedrinu a jim odpovídající deriváty oxazolidinu (vzniklé reakcí efedrinu se salicylaldehydem) byly testovány jako látky zvyšující pohybovou aktivitu⁶. Tento účinek mají všechny stereoisomery efedrinu, s výjimkou $(-)-(1R,2R)$ -pseudeofedrinu. Účinek klesá

v řadě $(-)-(1R,2S)$ -efedrin $>$ $(+)-(1S,2S)$ -pseudeofedrin $>$ $(+)-(1S,2R)$ -efedrin.

Kondenzační reakce (1) vedoucí ke vzniku derivátů oxazolidinu je rovnovážná. Právě vratnost reakce poskytuje nové možnosti přípravy léčiv s retardovanými účinky. Hydrolýzou oxazolidinového derivátu, připraveného z vhodného prekursoru (například ze skupiny amfetaminů), se v organismu postupně uvolňuje účinná substance. Takto lze přiblížit farmakokinetiku léčiva léčebným potřebám pacienta. Je známo, že absorpci, resorpci a eliminaci léčiva lze popsat kinetickou rovnicí prvního řádu. To znamená, že k zdvojnásobení doby trvání účinku je potřebné podat několikanásobně vyšší dávku. Aplikací neúčinného prekursoru se obvykle omezuje presystemická eliminace léčiva, tudíž je možno dávkování snížit a tím je organismus méně zatěžován.

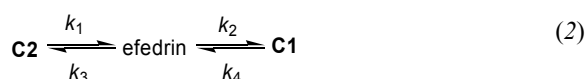
Cílem práce bylo shrnutí poznatků o vzniku oxazolidinových derivátů efedrinu a jejich hydrolýze. Pozornost byla věnována vlivu rozpouštědla a vlivu substituentu aromatického aldehydu na rovnováhu kondenzační reakce efedrinu a na stereoselektivitu této reakce.

2. Stereochemie vzniku derivátů oxazolidinu

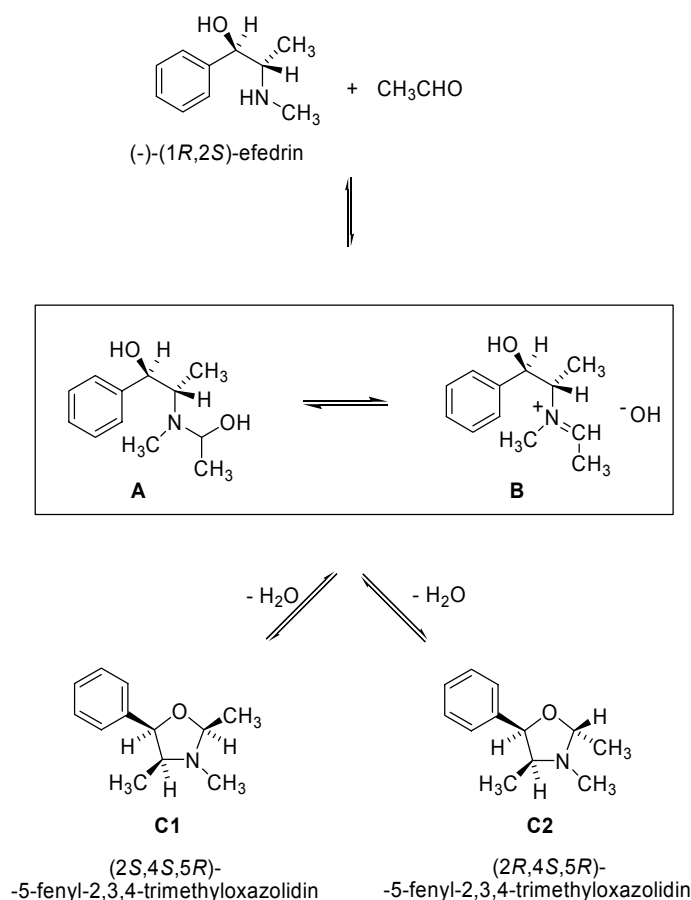
Stereochemií reakce (1) se zabývali Breckett a Jones⁷. Jako modelovou reakci zvolili kondenzaci $(-)-(1R,2S)$ -efedrinu s acetaldehydem. Autoři uvádějí, že tato reakce poskytuje dva produkty, jejichž poměr zjišťovaný GLC byl 10:1. Na základě spektroskopických metod (IR, NMR a MS) bylo zjištěno, že menší i větší pik v chromatogramu přísluší stereoisomerům 5-fenyl-2,3,4-trimethyloxazolidinu.

Následně bylo autory⁷ navrženo reakční schéma 1. Vznik derivátu oxazolidinu **C1** z acetaldehydu a efedrinu zřejmě probíhá přes hemiaminal **A** a přes iminiovou sůl **B**, jde však pouze o předpokládané meziproducty, které nebylo možné izolovat z reakční směsi. Předpokládá se však, že struktura **A** je nejpravděpodobnějším meziproductem vzniku 5-fenyl-2,3,4-trimethyloxazolidinu. Průběh reakce byl sledován⁷ metodou NMR. Během prvních 4 min vymizely signály $(-)-(1R,2S)$ -efedrinu a vznikly látky **C1** a **C2**. Intenzita signálů odpovídající isomeru **C2** následně začala klesat spolu s postupným nárůstem signálů isomeru **C1**. **C1** je termodynamicky výhodnější než isomer **C2**. Podobné výsledky dávala analýza GLC.

Z představ o mechanismu a z naměřených dat byl autory⁷ navržen kinetický model vyjádřený vztahem (2).



Pro tento vztah a kinetiku prvního řádu byly nalezeny relativní hodnoty rychlostních konstant: $k_1 = 72,3$; $k_2 = 36,4$; $k_3 = 16,3$ a $k_4 = 1$.

Schéma 1. Vznik derivátů oxazolidinu C1 a C2 z (-)-(1*R*,2*S*)-efedrinu a acetaldehydu⁷

Výskyt dvou diastereoisomerních derivátů oxazolidinu (**C1**, **C2**) je důsledkem vzniku dalšího chirálního centra (na atomu C2 oxazolidinu). Analogickou reakcí (+)-(1*S*,2*S*)-pseudoeofedrinu s acetaldehydem vznikly také dva diastereoisomery, hlavní (cca 95 %) a vedlejší (cca 5 %).

Breckett a Jones⁷ dále testovali aktivitu hydroxyskupiny a sekundární aminové skupiny při reakci s acetaldehydem. Jako modelové látky byly vybrány *N*-methylamfetamin a *N*-methylefedrin. Jde o reaktanty pouze s jednou reaktivní funkční skupinou (NH v prvním případě, resp. OH u druhého modelu). Bylo zjištěno, že tyto látky s acetaldehydem nereagují. Podobného výsledku bylo dosaženo při reakci acetaldehydu s *O*-trimethylsilylovým derivátem (–)(1*R*,2*S*)-efedrinu. Z uvedeného vyplývá, že pro cyklizaci na oxazolidinový kruh musí být u derivátů efedrinu volné skupiny OH i NH (viz reakce 1).

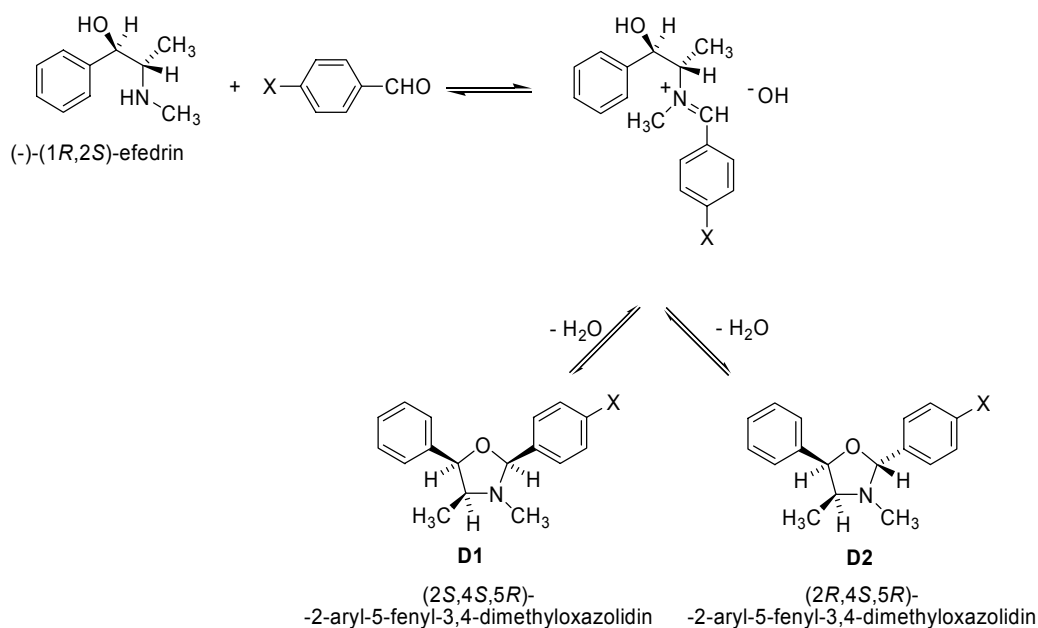
Využití derivátů oxazolidinu pro syntézu farmak s prodlouženým účinkem vyžaduje, aby při syntéze i hydrolýze v organismu nedocházelo k isomerizaci, a tím k degradaci účinné látky. Kyselá hydrolýza oxazolidinového derivátu připraveného z (-)-(1*R*,2*S*)-efedrinu a acetaldehydu vedla ke vzniku pouze efedrinu s původní konfigurací.

3. Vliv rozpouštědla na stereoselektivitu reakce efedrinu s aromatickými aldehydy

Aromatické aldehydy reagují s (–)-(1*R*,2*S*)-efedrinem podle schématu 2 v několika rovnovážných stupních⁸. Mechanismus reakce byl odvozen na základě dobře známé vratné reakce, tj. hydrolyzy derivátů oxazolidinu.

Stupněm určujícím konfiguraci produktu je intramolekulární adice hydroxyskupiny na dvojnou vazbu iminiové skupiny. Diastereodiferenciace může být řízena kineticky i termodynamicky. Významně se projeví vliv substituentu na aromatickém jádře aldehydu, jednak v preferenci určitého směru nukleofilního útoku na atom uhlíku nesoucí aryl a jednak v ovlivnění kondenzačně-hydrolytické rovnovážné konstanty.

V chloroformu nebo methanolu reaguje benzaldehyd ($X=H$) nebo 4-methoxybenzaldehyd ($X=OCH_3$) s $(-)-(1R,2S)$ -efedrinem za vzniku $(2S,4S,5R)$ -isomeru (**D1**) jako hlavního produktu (90 %) a $(2R,4S,5R)$ -isomeru (**D2**) jako minoritního produktu. Konfigurace produktů byla stanovena na základě 1H NMR. Poměr isomerů **D1** : **D2** = 9:1 je v reakční směsi konstantní a nezávisí na stupni konverze. Naproti tomu reakci $(-)-(1R,2S)$ -efedrinu s 4-kyanbenz-

Schéma 2. Reakce $(-)-(1R,2S)$ -efedrinu s aromatickými aldehydy

aldehydem ($\text{X}=\text{CN}$) nebo 4-nitrobenzaldehydem ($\text{X}=\text{NO}_2$, chloroform, teplota $0\text{--}20^\circ\text{C}$) vznikají zpočátku oba isomery **D1** i **D2** v přibližném poměru 50:50. Při konverzi blíží se rovnovážné byl shledán podobný výsledek jako v případě benzaldehydu nebo 4-methoxybenzaldehydu. Obsah hlavního produktu s konfigurací 2*S*,4*S*,5*R* byl přibližně 85 %.

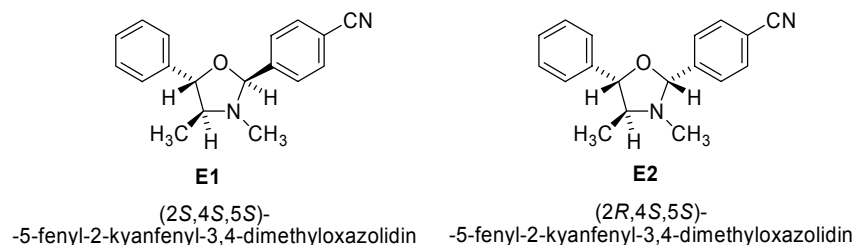
Jestliže kondenzace 4-kyan- nebo 4-nitrobenzaldehydu s $(-)-(1R,2S)$ -efedrinem probíhá v methanolu namísto chloroformu, uplatňuje se kinetický vliv substituentu na aromatickém jádře ještě výrazněji. Na počátku reakce vzniká výhradně produkt **D2**, po dlouhé reakční době již převládá produkt **D1**, podobně jako ve všech případech popsanych výše.

Významný vliv rozpouštědla vedl Agamiho a Rizka⁸ k ověření sporných výsledků Neelakantana^{1,2} získaných kondenzací $(-)-(1R,2S)$ -efedrinu a 4-brombenzaldehydu ($\text{X}=\text{Br}$) v absolutním ethanolu. Tato práce z roku 1971 uvádí, že produktem je isomer **D2**. Reprodukci kondenzace za podmínek uváděných v práci Neelakantana^{1,2} bylo

zjištěno, že produktem reakce je hlavně isomer **D1**. Nicméně isomer **D2** je možno izolovat za pečlivě řízených podmínek, pouze však v případě, že reakce probíhala ve vodném ethanolu.

Isomerizace oxazolidinu **D2** ($\text{X} = \text{Br}$) na **D1** isomer v methanolu vede ke vzniku rovnovážné směsi obou isomerů (**D1/D2** = 87/13). Již dříve bylo publikováno⁹, že oxazolidin jako součást artisinu je náchylný k isomerizaci, aniž je reakce katalyzována. Autoři⁸ zjistili, že isomerizace probíhá také při pokojové teplotě v méně polárních rozpouštědlech (benzen, dioxan).

Tyto výsledky sice potvrdily, že oxazolidin **D2** je možno získat v prostředí ethanolu, ale podmínky navržené Neelaktanem a spol.^{1,2} nejsou nejvhodnější pro vznik tohoto isomeru. Je velice pravděpodobné, že jejich interpretace vyplývá z nižší rozpustnosti isomeru **D2** v porovnání s **D1** oxazolidinem, a tak náhodně vybraný krystal, který byl podroben rentgenostrukturním analýzám, nebyl dostatečně reprezentativním vzorkem izolovaného produktu.

Schéma 3. Produkty reakce $(+)-(1S,2S)$ -pseudoefedrinu s 4-kyanbenzaldehydem

Čistý isomer **D1** je možno pohodlně získat jednoduchou krystalizací z vroucího ethanolu, z rovnovážné směsi, která obsahuje jen velmi malé množství druhého isomeru **D2**.

Podobně jako v případě $(-)-(1R,2S)$ -efedrinu bylo i pro $(+)-(1S,2S)$ -pseudoefedrin dosaženo na počátku reakce s 4-kyanbenzaldehydem v chloroformu poměru produktů **E1** : **E2** = 1:1, při dlouhé reakční době byl jediným produktem oxazolidinový derivát **E1** (schéma 3).

Výrazný rozdíl v reaktivitě $(-)-(1R,2S)$ -efedrinu a $(+)-(1S,2S)$ -pseudoefedrinu se projevil v reakci s 4-kyanbenzaldehydem v methanolu. Na počátku reakce $(+)-(1S,2S)$ -pseudoefedrinu (při 10% konverzi) vznikají produkty **E1** a **E2** v poměru 3:1, zatímco na počátku reakce $(-)-(1R,2S)$ -efedrinu vzniká výhradně jeden produkt, a to isomer **D1**.

Je patrné, že jak substituenty benzaldehydu, tak rozpouštědlo, ovlivňují rychlost reakce efedrinu s deriváty benzaldehydu. Přesto, že nejsou uváděny reakční rychlosti, lze z publikovaných údajů vyvozovat, že se v polárních rozpouštědlech rychlost reakce snižuje. Rovněž elektroakceptorové substituenty snižují reaktivitu derivátů benzaldehydu. Kondenzace efedrinu s arylaldehydem se patrně za uvedených podmínek pohybuje na rozhraní kinetického a termodynamického řízení. Při snížení rychlosti kondenzace uvedenými substitučními vlivy nebo nižší reakční teplotou se více projeví různé reakční rychlosti jednotlivých jednosměrných reakcí (kinetické řízení). Naopak probíhají-li reakce rychle, zdánlivě vzniká rovnou konečný – rovnovážný produkt **D1** nebo **E1** (termodynamické řízení). Přestože jednotlivé reakce probíhají rychle, výsledná rychlost přeměny efedrinu nemusí být extrémně vysoká. Ta je totiž pro uvažovanou soustavu reakcí zachycenou rovnicí (3) závislá na rychlosti čtyř dílčích reakcí (viz vztah (2)):

$$-r_{\text{ef}} = r_2 + r_3 - r_1 - r_4 \quad (3)$$

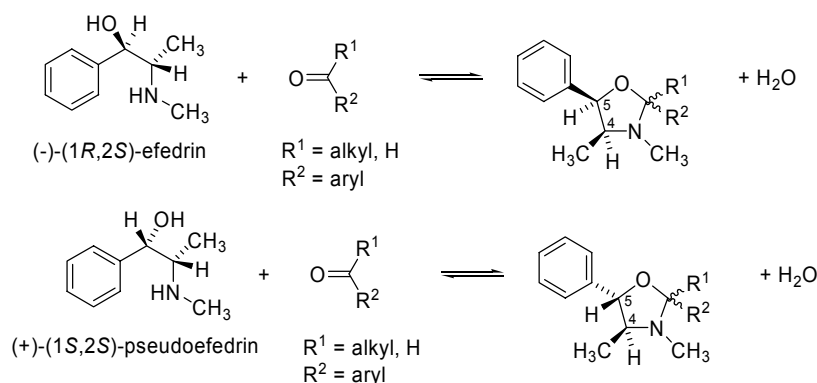


Schéma 4. Relativní konfigurace na atomech C4 a C5 kondenzačních produktů efedrinu a pseudoefedrinu

4. Hydrolýza derivátů oxazolidinu

Deriváty oxazolidinu podléhají ve vodném prostředí velice snadno hydrolýze za vzniku β -aminoalkoholů a karbonylových sloučenin, ze kterých byly syntetizovány^{10,11}. Měřením poločasu hydrolýzy derivátů oxazolidinu ve vodném pufru bylo zjištěno¹⁰, že se deriváty odvozené od $(-)-(1R,2S)$ -efedrinu hydrolyzují rychleji než jejich analoga z $(+)-(1S,2S)$ -pseudoefedrinu. U derivátů oxazolidinu bylo prokázáno^{3,12}, že tvoří komplexy s cyklohextriny. Rychlost hydrolýzy těchto komplexů, v porovnání s volnými deriváty oxazolidinu, je podstatně nižší^{3,5}.

Nejčastěji v přírodě se vyskytující cyklohextriny jsou α -, β - a γ -cyklohextriny³, které obsahují šest, sedm, resp. osm glukosových jednotek. β -Cyklohextriny mají nejvhodnější vlastnosti pro tvorbu komplexů s mnoha léčivými, mají však velice nízkou rozpustnost ve vodě a mohou být i nefrotoické. Několik substituovaných cyklohextrinů vykazuje vyšší rozpustnost ve vodě a zároveň nižší toxicitu než nemodifikované β -cyklohextriny. Nejpoužívanější jsou hydroxypropyl- β -cyklohextrin (HP- β -CD), heptakis-(2,6-di-*O*-methyl)- β -cyklohextrin (DM- β -CD) a sulfobutyl-ether- β -cyklohextrin (SBE- β -CD).

Biologická aktivita byla testována³ u jednoho cyklohextrin-oxazolidinového komplexu. Jako prekurzor účinné látky, $(-)-(1R,2S)$ -efedrinu, byl zvolen 5-fenyl-2-(4-methoxyfenyl)-3,4-dimethyloxazolidin, vznikající reakcí efedrinu s 4-methoxybenzaldehydem. Tento oxazolidinový derivát tvoří komplex s HP- β -CD. Bylo zjištěno³, že jak $(-)-(1R,2S)$ -efedrin, tak odpovídající 5-fenyl-2-(4-methoxyfenyl)-3,4-dimethyloxazolidin zvyšují u krys pohybovou aktivitu, jsou-li podány perorálně či intraperitoneálně. Při perorálním podání je pro dosažení optimálního účinku třeba podat vyšší dávku. Komplex derivátu oxazolidinu s HP- β -CD začíná účinkovat pomalu, ale působí delší dobu.

Objasnění mechanismu hydrolýzy derivátů oxazolidinu bylo věnováno několik prací^{10,13–15}. Bylo prokázáno, že

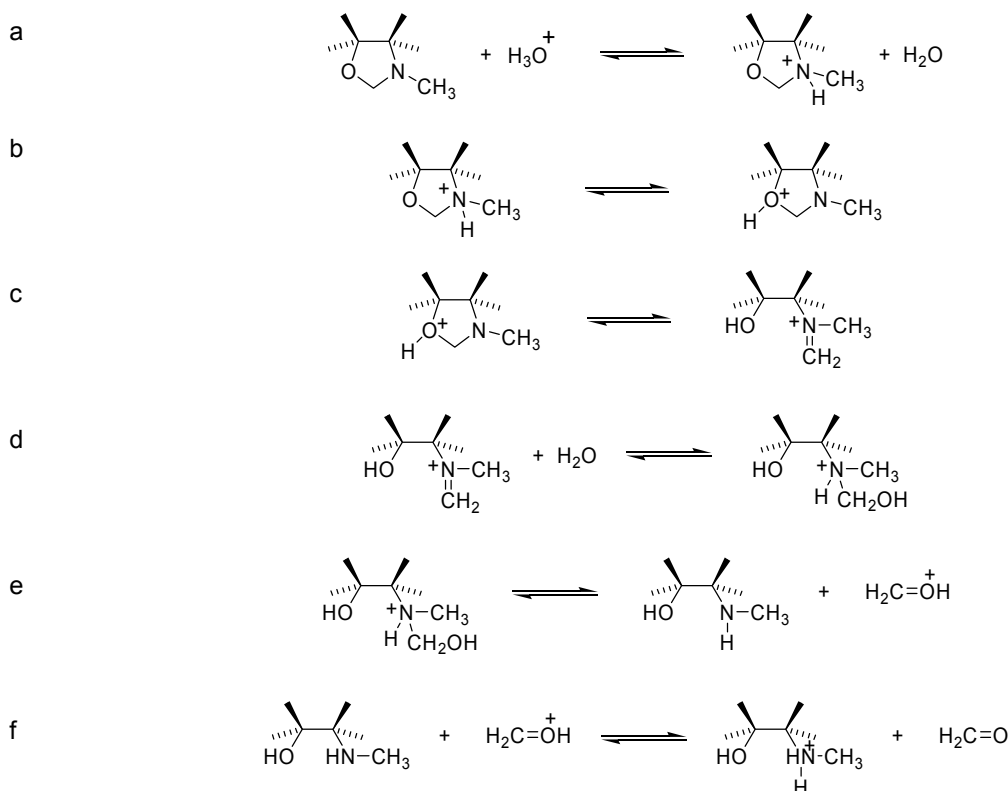


Schéma 5. Mechanismus hydrolýzy derivátů oxazolidinu¹⁵; a) protonace na N-3; b) protonace na O-1; c) otevření O-protonovaného oxazolidinu; d) hydratace iminia na protonovaný aminoalkohol; e) rozklad protonovaného aminoalkoholu; f) reprotonace dusíkového atomu

změna prostředí či změna konfigurace na chirálních centrech derivátů oxazolidinu má vliv na rychlost hydrolýzy¹⁰. (–)-(1*R*,2*S*)-Efedrin reaguje s aldehydem nebo ketonem za vzniku derivátu oxazolidinu s *cis*-konfigurací na atomech C4 a C5. Naproti tomu (+)-(1*S*,2*S*)-pseudofedrin poskytuje oxazolidin s relativní konfigurací *trans* na C4 a C5 (schéma 4). Experimentálně bylo dokázáno, že z uvedených derivátů oxazolidinu obvykle při neutrálním nebo alkalickém pH se hydrolyzuje rychleji *cis*-isomer odvozený od (–)-(1*R*,2*S*)-efedrinu než analogický *trans*-isomer odvozený od (+)-(1*S*,2*S*)-pseudofedrinu¹⁰.

Matematickým modelováním byl navržen mechanismus hydrolýzy a vysvětleny rozdíly v rychlostech hydrolýzy isomerů derivátů oxazolidinu¹⁵. Jako modelové látky byly zvoleny *cis*- a *trans*-isomer 5-fenyl-3,4-dimethyl-oxazolidinu. Tyto látky snadno vznikají reakcí formaldehydu s (–)-(1*R*,2*S*)-efedrinem a (+)-(1*S*,2*S*)-pseudofedrinem^{10,11}. Rozdíl v rychlosti hydrolýzy *cis*- a *trans*-isomeru je způsoben faktem, že protonace kyslíku a následné otevření kruhu za vzniku iminiového iontu vyžaduje pro *cis*-isomer nižší energii než je tomu v případě *trans*-isomeru. Nepříznivé sterické interakce v *cis*-isomeru upřednostňují otevření oxazolidinového kruhu. *Cis*-isomer prochází lidskými tkáněmi rychleji¹¹ a má určité sympatomimetické účinky na pokusná zvířata^{5,6}. Jestliže je rozpuš-

těn ve vodném roztoku o neutrálním nebo alkalickém pH, dochází k velice rychlé hydrolýze na (–)-(1*R*,2*S*)-efedrin a formaldehyd^{6,10,11}. Bylo prokázáno, že nedochází k úplné hydrolýze derivátu oxazolidinu, ale k ustavení rovnovážné koncentrace oxazolidinu, (–)-(1*R*,2*S*)-efedrinu a formaldehydu¹¹.

Obecně akceptovaný mechanismus hydrolýzy derivátů oxazolidinu tohoto typu je znázorněn schématem 5.

U několika derivátů oxazolidinu odvozených od (–)-(1*R*,2*S*)-efedrinu a (+)-(1*S*,2*S*)-pseudofedrinu a různých

Tabulka I

Poločas hydrolýzy oxazolidinových derivátů na (–)-(1*R*,2*S*)-efedrin a uvedený aldehyd nebo keton⁸

Produkt hydrolýzy	Poločas hydrolýzy [min]
Formaldehyd	0,08
Salicylaldehyd	0,08
Propionaldehyd	0,3
Aceton	4
Benzaldehyd	5
Cyklohexanon	6
2,2-Dimethylpropanal	30

aldehydů či ketonů byla studována rychlost jejich hydrolyzy¹⁰. Bylo zjištěno, že oxazolidiny se při teplotě 37 °C hydrolyzují v rozmezí pH 1–11, rychlost hydrolyzy však silně závisí na pH prostředí. Pro většinu derivátů oxazolidinu vykazuje závislost rychlosti hydrolyzy na pH esovitý tvar s maximem při pH vyšším než 7. Při pH 7,4 a teplotě 37 °C byly změřeny poločasy hydrolyzy několika oxazolidinových derivátů (tabulka I).

Reakční rychlost v neutrálním a alkalickém prostředí klesá se vzrůstajícím sterickým efektem karbonylové sloučeniny a zároveň klesá se vzrůstající bazicitou derivátů oxazolidinu. Deriváty oxazolidinu jsou slabší báze (pK_a 5,2–6,9) než β -aminoalkoholy, z nichž vznikají, a zároveň jsou lipofilnější při fyziologickém pH. Při jejich farmaceutickém využití se však musí brát zřetel na toxicitu uvolněné karbonylové sloučeniny.

5. Závěr

Oxazolidinové deriváty jsou považovány za potenciální farmaceutické substance umožňující výrobu léčiv s retardujícím účinkem. Z důvodů možného použití oxazolidinových derivátů jako proléčiv byla věnována pozornost stereoselektivitě jejich vzniku a hydrolyze za fyziologických podmínek. Bylo zjištěno, že reakcí efedrinu s některými aldehydy nebo ketony vznikají dva produkty s odlišnou konfigurací. Existence dvou stereoisomerních derivátů oxazolidinů je důsledkem vzniku chirálního centra na uhlíku C2 oxazolidinu.

Volbou rozpouštědla a doby reakce je možné ovlivnit stereoselektivitu reakce efedrinu s aromatickými aldehydy. Při reakci 4-kyanbenzaldehydu nebo 4-nitrobenzaldehydu s (–)-(1*R*,2*S*)-efedrinem v chloroformu vznikají na počátku reakce deriváty oxazolidinu s konfigurací 2*S*,4*S*,5*R* a 2*R*,4*S*,5*R* v poměru 1:1, zatímco při použití methanolu jako rozpouštědla je na počátku reakce jediným produktem derivát oxazolidinu s konfigurací 2*R*,4*S*,5*R*.

Výrazný vliv na rychlost vzniku derivátů oxazolidinu mají také substituenty aromatického aldehydu. Elektrondonorové substituenty rychlost zvyšují natolik, že obsah produktů kondenzace v reakční směsi vždy odpovídá rovnovážnému stavu.

Ve vodném prostředí oxazolidinové deriváty připravené z (–)-(1*R*,2*S*)-efedrinu snadno hydrolyzují. Poločas hydrolyzy při 37 °C dosahuje maximálně několik minut. Během hydrolyzy se nemění konfigurace na chirálních centrech efedrinu. Z derivátů oxazolidinu obvykle při neutrálním nebo alkalickém pH hydrolyzuje rychleji *cis*-isomer (odvozený od (–)-(1*R*,2*S*)-efedrinu) než analogický *trans*-isomer odvozený od (+)-(1*S*,2*S*)-pseudoeferdinu. Deriváty oxazolidinu tvoří komplexy s cyklodextriny. Tyto komplexy se hydrolyzují pomaleji. Proto je zvažováno jejich farmaceutické využití.

Tato práce vznikla za podpory GA ČR (grant č. 203/03/H140).

LITERATURA

1. Neelakantan L.: J. Org. Chem. 36, 2256 (1971).
2. Neelakantan L., Molin-Case J. A.: J. Org. Chem. 36, 2261 (1971).
3. Walker R., Dholakia V., Brasifield K., Bakhitar R.: Gen. Pharmacol. 30, 725 (1998).
4. Walker R., Fitz L., Williams L., McDaniel Y.: Gen. Pharmacol. 27, 109 (1996).
5. Walker R., Fitz L., Williams L., Linton H., Smith C.: Gen. Pharmacol. 24, 669 (1993).
6. Walker R., Wood D., Akmal M., Sharks E.: Gen. Pharmacol. 23, 729 (1992).
7. Beckett A. H., Jones G. R.: Tetrahedron 33, 3313 (1977).
8. Agami C., Rizk T.: Tetrahedron 41, 537 (1985).
9. Pelletier S. W., Mody N. V., Desai H. K., Finer-Moore J., Nowacki J., Joshi B. S.: J. Org. Chem. 48, 1787 (1983).
10. Bundgaard H., Johansen M.: Int. J. Pharm. 10, 165 (1982).
11. Young-Harvey J., Rae I., Pitman I.: Int. J. Pharm. 30, 151 (1986).
12. Bakhtiar R., Hop C., Walker R.: Rapid Commun. Mass Spectrom. 729 (1997).
13. Fife T., Hutchings J.: J. Org. Chem. 45, 2099 (1980).
14. McClelland R., Somani R.: J. Org. Chem. 46, 4345 (1981).
15. Walker R., Ming-Ju Hang, Lesyczynski J.: THEO-CHEM 549, 137 (2001).

M. Astrová, L. Kurc, and L. Červený (*Department of Organic Technology, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Oxazolidine Derivatives of Ephedrine**

The knowledge of the formation of oxazolidine derivatives from ephedrine and an aromatic aldehyde and their back hydrolysis is reviewed. Their most significant potential utilization in pharmacy is based on their facile hydrolysis, which makes it possible to prepare pharmaceutical substances with retarded activity. This application depends on the configurational stability of the substance during condensation and hydrolysis.

FUKOSIDASY A OLIGOSACHARIDY OBSAHUJÍCÍ FUKOSU

EVA BENEŠOVÁ, MICHAELA MARKOVÁ,
PETRA LIPOVOVÁ a BLANKA KRÁLOVÁ

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT, Technická 5,
166 28, Praha 6
urbankoe@vscht.cz

Došlo 9.11.04, přijato 20.12.04.

Klíčová slova: fukosidasa, fukosa, fukosidosa, cystická
fibrosa

Obsah

1. Úvod
2. Fukosidasy
3. Fukosa a glykokonjugáty obsahující fukosu
4. Fukoidan
5. Inhibitory fukosidas
6. Onemocnění související s fukosou a α -L-fukosidasou
 - 6.1. Fukosidosa
 - 6.2. Cystická fibrosa
 - 6.3. Revmatická artritida
 - 6.4. Rakovinová onemocnění
 - 6.5. Záněty
 - 6.6. Syndrom LAD
7. Závěr

1. Úvod

Alfa-L-fukosidasy jsou enzymy, které se vyskytují ve velkém množství organismů a odštěpují fukosylový zbytek z postranních řetězců oligosacharidů, glykoproteinů a glykolipidů. Účastní se mnoha důležitých metabolických procesů a jejich nedostatek je příčinou vzniku některých závažných onemocnění^{1,2}. Glykokonjugáty obsahující fukosu mají mnoho zajímavých biologických vlastností. Vyskytují se v úloze receptorů buněčného povrchu nebo růstových regulátorů, účastní se mezibuněčných interakcí, hraje důležitou roli jako antigenní determinanty a jsou nezbytné pro správnou funkci imunitního systému. Jejich chemická syntéza je velmi náročná, a proto se intenzivně studuje možnost jejich přípravy pomocí enzymů schopných katalyzovat transglykosylační reakce. Úspěch v této oblasti by umožnil lepší dostupnost mnoha látek potenciálně využitelných v medicíně³.

2. Fukosidasy

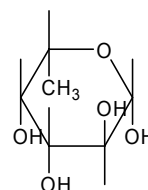
α -L-Fukosidasy (EC 3.2.1.51) jsou obecně rozšířené enzymy řazené do třídy hydrolas. Jedná se o exoglykosidasy, které odštěpují z neredukujících konců postranních řetězců oligosacharidů, glykoproteinů a glykolipidů fukosylový zbytek za vzniku fukosy a alkoholu^{1,4}. Glykosidasy se obecně dělí do 97 rodin na základě podobnosti primární struktury v okolí aktivního místa. α -L-Fukosidasy byly zařazeny pouze do dvou rodin, a to 29 a 95. Enzymy řazené do rodiny 29 katalyzují reakci způsobem, při kterém si produkt zachovává stejnou konfiguraci vazby, jako měl substrát, zatímco u enzymů z rodiny 95 tato konfigurace zachována nezůstává^{5,6}.

Výskyt α -L-fukosidas byl potvrzen u mnoha různých organismů včetně bakterií, plísní, měkkýšů, řas, rostlin a savců⁴ a bylo zjištěno, že substrátová specifita závisí na zdroji, ze kterého jednotlivé enzymy pocházejí. Obvykle platí, že fukosidasy savčích tkání mají širší substrátovou specifitu než jejich mikrobiální protějšky³.

Význam těchto enzymů spočívá v účasti na metabolismu mnoha biologicky aktivních molekul obsahujících L-fukosu a jejich nedostatek může být příčinou některých závažných onemocnění. Kromě toho jsou fukosidasy využívány při studiu struktury a funkce různých glykokonjugátů⁷. Vzhledem k tomu je s podivem, jak málo pozornosti jim bylo dosud věnováno, zvláště pak mechanismu jejich působení.

3. L-Fukosa a glykokonjugáty obsahující L-fukosu

L-Fukosa neboli 6-deoxy-L-galaktosa (obr. 1) je jeden z monosacharidů obvykle přítomných v glykokonjugátech jako jsou glykoproteiny a glykolipidy^{2,8,9}. Vyskytuje se převážně v α -anomerické konfiguraci a bývá připojena různými typy vazeb, např. α -(1,2) vazbou na D-galaktosu, nebo α -(1,3), α -(1,4), α -(1,6) vazbou na acetyl-D-glukosamin^{10,11}. Takto připojené zbytky se nejčastěji vyskytují na koncích sacharidových řetězců, což umožňuje jejich odštěpování fukosidasami⁴.



Obr. 1. Haworthův vzorec α -L-fukosy⁸

L-Fukosa patří mezi obtížně dostupné sacharidy, a proto jsou ověřovány různé metody, které by umožnily její jednoduché získávání. Jednou z těchto metod je např. hydrolýza fukoidanu neboli komplexní struktury sestávající ze sulfatovaných L-fukosových jednotek produkované některými řasami. Pro produkci L-fukosy touto hydrolýzou byly použity fukoidany produkované řasami *Pelvetia canaliculata*, *Fucus vesiculosus* nebo *Ascophyllum nodosum*. Další možností produkce L-fukosy je přímá chemická syntéza, při které se využívá různých běžně se vyskytujících sacharidů, jako je L-arabinosa, D-glukosa, methyl-L-rhamnosa, D-mannosa nebo D-galaktosa. Byla testována i enzymová syntéza L-fukosy, při které jako výchozí sloučeniny sloužily dihydroxyacetonfosfát a lactaldehyd. Jako zdroj fukosy je také možno využít přímo fukosu obsahující polysacharidy a lipopolysacharidy některých bakterií. Chemická syntéza je velmi obtížná a drahá, stejně tak i extrakce z rostlinných a živočišných tkání, kde je situace ještě komplikována dostupností zdrojových materiálů².

Vyvinutí snadné a levné metody produkce fukosy je v současné době důležitým cílem, neboť její vlastnosti ji předurčují k aplikaci v různých medicínských odvětvích. Např. bylo zjištěno, že pokud by bylo tělo uměle zásobováno tímto sacharidem, mohlo by dojít k zamezení vazby lektinů na bakteriálním povrchu na sacharidové receptory hostitelských buněk, a tím k zeslabení nebo úplnému potlačení infekce¹⁰. L-Fukosa našla uplatnění i v kosmetice. Byl objeven extracelulární bakteriální polysacharid sestávající z L-fukosy, D-galaktosy a galakturonové kyseliny, který je schopen vytvořit ochranný film ochraňující pokožku před vstupem látek způsobujících podráždění¹². V současné době je distribuován pod názvem Fucogel 1000. Dále bylo potvrzeno, že L-fukosa má schopnost potlačovat kožní alergickou reakci^{2,9,10}.

Glykoproteiny a glykolipidy obsahující L-fukosylový zbytek na neredukujícím konci jsou známy jako důležité složky mezibuněčné komunikace, jako receptory buněčného povrchu nebo jako růstové regulátory^{3,9,13}. Mimo to obecně platí, že cukerná složka glykoproteinu ovlivňuje jeho stabilitu, kinetické vlastnosti, svinování, intracelulární transport i sekreci¹.

V lidském organismu se glykokonjugáty obsahující L-fukosu vyskytují velmi hojně. Byly detegovány např. v mozku a na synaptických spojích, což naznačuje roli v přenosu signálu, v proximálních tubulech ledvin, ve fotoreceptorové vrstvě oční sítnice, v epidermálních buňkách kůže, v endotelu žláz a cév, v makrofázích a v antigenech červených krvinek, čehož je využíváno při rozlišování krevních skupin. Důležitou roli nepochybně hrají i v reprodukčním procesu^{4,9,10}. Dále byly L-fukosylované glykokonjugáty detegovány v mateřském mléce, kde byla prokázána jejich schopnost inhibovat vazbu patogenů v trávicím traktu kojenců na specifické receptory, a tím zamezovat infekci buňky. Příkladem takto inhibovaných patogenů mohou být některé kmeny bakterie *Escherichia coli* nebo *Campylobacter jejuni*¹⁴. Také přítomnost glykokonjugátů na povrchu bakteriálních buněk hraje důležitou roli v rozpoznávání a imunitní odpovědi vyšších organis-

mů na infekci.

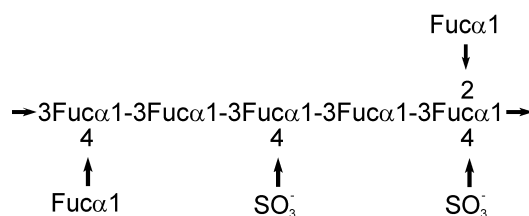
L-Fukopyranosylové jednotky se také vyskytují v rostlinných polysacharidech, kde mohou být v některých případech methylované. Dále jsou součástí již dříve zmínovaného polysacharidu chaluhy (fukoidanu) a extracelulárních polysacharidů bakterií, hub a mikrořas².

Vzhledem k významu glykokonjugátů obsahujících fukosu bylo provedeno mnoho chemických syntéz, které měly napomoci objasnění jejich biologické funkce. Vedle studia mnoha struktur vyskytujících se v přírodě byla testována i syntéza konjugátů nových^{4,15}. Chemický způsob syntézy glykokonjugátů je ovšem velmi komplikovaný, a proto se využívá i možnosti aplikace fukosidas, schopných katalyzovat transglykosylační reakce. Výhodou použití těchto enzymů je jejich vysoká stereo- a regioselektivita a také fakt, že pro reakci nejsou potřebné drahé kofaktory ani donory přenášeného L-fukosylového zbytku. Schopnost katalyzovat transglykosylační reakce byla detegována například u fukosidas pocházejících z prasečích jater, hovězích ledvin, z tkání šneka *Ampullaria*, z plísní *Aspergillus niger* a *Penicillium multicolor* a bakterií *Alcaligenes* sp a *Corynebacterium* sp. Jako donor L-fukosylového zbytku byl používán *p*-nitrofenyl- α -L-fukopyranosid nebo α -L-fukopyranosyl fluorid, jako akceptory sloužily D-galaktosa, D-glukosa a acetyl-D-glukosamin^{3,11,15,16}.

4. Fukoidan

Některé chaluhy jsou schopné syntetizovat komplexní polysacharidové struktury, složené ze sulfatovaných L-fukosových polymerů, zvané fukoidany. V těchto strukturách byly detegovány různé typy glykosidických vazeb a cílené studie prokázaly, že struktura fukoidanů může být velmi komplikovaná¹⁷ (obr. 2). Pro extrakci fukoidanu jsou používány například chaluhy *Ecklonia kuro-me*, *Laminaria angustata* var *longissima*, *Fucus vesiculosus*, *Kjellmaniella crassifolia*, *Pelvetia canaliculata* a *Fucus serratus* L (cit.²).

Po zjištění, že fukoidan má mnohé medicínsky významné vlastnosti a zároveň nepůsobí toxicky ani dráždivě na lidský organismus, začala být této sloučenině věnována výrazná pozornost. Byl prokázán inhibiční účinek na adhezi bakteriálních buněk na buňky hostitelské¹⁸, antivirální



Obr. 2. Příklad struktury fukoidanu z *Fucus vesiculosus*¹⁷

působení proti herpes simplex viru a lidskému cytomegaloviru, potvrzeny byly i antikoagulační a antitrombotické schopnosti¹⁹ a protinádorové působení vyvolávající samodestrukci nádorových buněk bez poškození buněk zdravých²⁰. V současné době je snaha o detailní pochopení struktury a mechanismu působení fukoidanu, neboť to by mohlo vést k novým možnostem léčby některých onemocnění.

5. Inhibitory fukosidas

Fukosidasy se spolu s dalšími enzymy účastní metabolismu glykokonjugátů obsahujících fukosu, a proto jsou inhibitory těchto enzymů důležitým nástrojem při studiu biologických procesů zahrnujících fukosylované glykokonjugáty^{21,22}. Aplikace inhibitorů ke kontrole a modulaci buněčných procesů ovšem není jejich jediné možné využití. Jsou důležité i pro studium reakčního centra enzymu nebo mechanismu, kterým enzymy katalyzují příslušné reakce²³. Neméně významná je i jejich role jako potenciálních látek při léčbě různých nemocí, jako jsou cukrovka, rakovina, virální infekce včetně AIDS nebo fukosidosa²³⁻²⁵. Inhibitory reálně využitelné v medicíně však musí splňovat mnoho zásadních požadavků, mj. netoxický vliv na lidský organismus a enzymovou specifitu²¹. Proto v současné době roste snaha o získání jednoduchého způsobu přípravy velkého množství různých inhibitorů, jejichž vlastnosti by následně mohly být testovány v lékařské praxi.

6. Nemoci související s fukosou a α -L-fukosidasou

S α -L-fukosidasami a L-fukosou souvisí mnohá závažná onemocnění. Některá z nich jsou způsobena defektní nebo úplně chybějící α -L-fukosidasou, u jiných jsou změny fukosylace pouze doprovodným jevem. Je ovšem nutné si uvědomit, že změny v glykosylacích byly detegovány i např. v těhotenství a nemusí tedy být v každém případě indikátorem některého z níže uvedených onemocnění¹⁰.

6.1. F u k o s i d o s a

Fukosidosa je velmi vzácné dědičné lysosomální onemocnění, které je způsobeno nedostatkem α -L-fukosidasy a jedná se tedy o vrozenou vadu metabolismu, která specificky ovlivňuje lysosomální trávení. Dochází k abnormálnímu ukládání glykokonjugátů obsahujících L-fukosu v mnoha tělních orgánech, jako jsou játra, slezina, srdce, brzlík, štítná žláza, ledviny nebo mozek^{23,26-28}.

Nedostatek α -L-fukosidasy je způsoben mutacemi v genu FUCA 1, lokalizovaném na chromosomu 1. V současné době bylo popsáno přibližně dvacet různých mutací tohoto genu^{28,29}.

Nemoc se dělí na dva nebo tři typy. Při dvoutypovém dělení je pro klasifikaci rozhodující síla projevu jednotli-

vých symptomů. Typem 1 je nazýván těžší průběh nemoci a první projevy se objevují přibližně v 6 měsících života. Smrt pacienta pak nastává během prvních deseti let života. Průběh nemoci je provázen neurologickou degenerací, retardací růstu a deformacemi kostí, zvětšením útrobních orgánů, ztrátou dříve získaných intelektuálních vlastností a chybou funkcí některých orgánů²⁶⁻²⁸. Typem 2 je označována lehčí forma nemoci a vyskytuje se u většiny pacientů. Průběh degenerace je zde výrazně pomalejší, je provázen tvorbou angiokeratomu a pacienti se v některých případech dožívají až čtvrté dekády života²⁶⁻²⁸.

Při klasifikaci nemoci do tří typů je rozhodujícím faktorem věk, ve kterém se příznaky nemoci objeví. U typů 1 a 2 dochází k vypuknutí nemoci v 10 resp. 18 měsících života. Typem 3 je i zde označována mírnější forma nemoci^{26,28}.

Nemoc je diagnostikována stanovením enzymové aktivity α -L-fukosidasy v moči, leukocytech, fibroblastech a případně dalších tkáních. V současné době je možná i prenatální diagnostika. Dosud však neexistuje žádná specifická terapie³⁰.

6.2. C y s t i c k á f i b r o s a

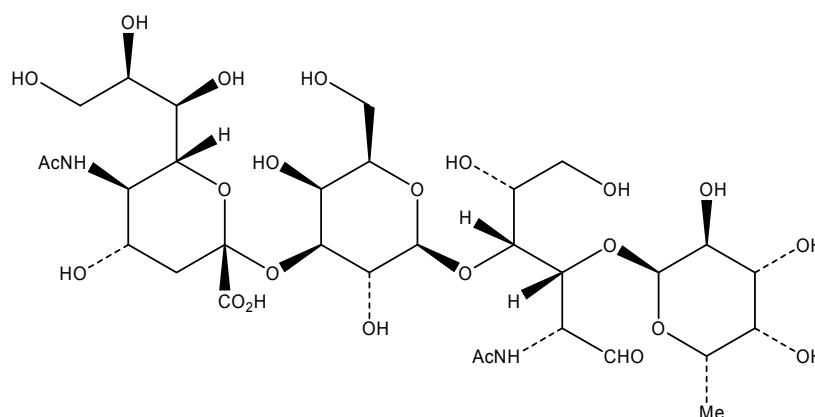
Cystická fibrosa je nejčastější smrtelné genetické onemocnění mezi bělochy. Příčinou tohoto onemocnění je poškození genu CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), který kóduje transmembránový protein sloužící jako kanál pro přechod iontů Cl^- (cit.³⁰). Bylo identifikováno více než 900 možných mutací, které byly rozděleny do několika tříd podle efektu na expresi, následnou modifikaci a funkci proteinu^{31,32}.

Při poškození genu CFTR dochází k narušení výměny chloridových iontů, sodných iontů a molekul vody a v poškozených orgánech vzniká abnormálně hustý hlen³³. V plicích je znemožněno dokonalé a rychlé odstraňování nečistot a mikroorganismů a dochází ke kolonizaci bakteriemi. Nejčastěji se jedná o bakterii *Pseudomonas aeruginosa*. Kolonizace je podporována i zvýšenou koncentrací sodíku a chloru v tekutině na povrchu dýchacích cest, neboť dochází k inaktivaci některých peptidů, u nichž byly prokázány antimikrobiální vlastnosti³⁰.

Při cystické fibrose jsou ovšem zasaženy i orgány trávicího traktu. Dochází k omezení průchodnosti slinivky břišní, čímž je znemožněn přístup některých trávicích enzymů do střev. Živiny proto zůstávají nevyužity, dochází k negativnímu ovlivnění růstu pacientů, k úbytku na hmotnosti a k postupnému zhoršování celkového stavu. Různé komplikace se ovšem mohou vyskytnout téměř ve všech tělních systémech a průběh nemoci je u jednotlivých pacientů odlišný³³.

U pacientů s cystickou fibrosou byly zjištěny změny v glykosylaci některých glykokonjugátů. Zaznamenána byla zvýšená fukosylace a/nebo snížená sialylace^{31,32}. Zvýšený výskyt L-fukosylových zbytků může být následkem snížené aktivity enzymu α -L-fukosidasy^{9,32}.

Cystická fibrosa patří v současné době mezi neléčitelné choroby, existují však inhalační a rehabilitační terapie, které napomáhají zlepšení kvality života pacientů. I přes



Obr. 3. Struktura tetrasachridu Sialyl Lewis X

několikrát denně opakovanou terapii se však onemocnění s věkem zhoršuje. Proto je v současné době prováděno několik studií genové terapie, která by měla umožnit vložení nepoškozené DNA genu CFTR do buněk respiračního traktu. Jiným přístupem k léčení této nemoci by mohla být aplikace metod plicní transplantace^{30,33}.

6.3. Revmatická artritida

Revmatická artritida je jedna z nejběžnějších forem artritidy. Jedná se o poměrně běžné onemocnění, které napadá celé tělo a při kterém dochází k zánětům vnitřní vrstvy kloubního pouzdra. Příčina této nemoci nebyla ještě přesně zjištěna, ale je známo, že jde o autoimunitní onemocnění, kdy chybná funkce imunitního systému vyústí v napadení vlastních zdravých kloubních tkání, vzniká zánět a může dojít až k úplnému zničení chrupavky kosti případně okolních tkání. Průvodními znaky této nemoci jsou bolesti a ztuhlost kloubů, zarudnutí a otoky^{34,35}.

Analýzou vzorků pacientů trpících revmatickou artritidou byl zjištěn vztah mezi snižujícím se obsahem L-fukosy v séru a dobou trvání nemoci, počtem napadených kloubů a narušením kostí. Obsah L-fukosy v séru může tedy být indikátorem postupu nemoci².

6.4. Nádorová onemocnění

Změny ve fukosylaci molekul, jako jsou oligosacharidy, glykoproteiny a glykolipidy, byly zjištěny ve tkáních pacientů trpících rakovinovými onemocněními^{5,9}. Tento jev souvisí s aktivitou fukosyltransferasy, jejíž několikanásobně zvýšená aktivita byla detegována v séru pacientů s maligním či metastatickým nádorovým onemocněním. Mimo to bylo ověřeno, že v moči pacientů s diagnostikovanou rakovinou je výrazně vyšší hladina volné L-fukosy než u kontrolních vzorků². Tím se naskytá možnost využívat stanovení fukosyltransferasové aktivity k predikci a včasné diagnostice nádorových onemocnění¹³.

Během studia nádorových onemocnění bylo zjištěno, že ne všechny nádorové buňky jsou schopné metastatického šíření tělem. Za toto šíření je ve skutečnosti zodpovědná jen malá skupina buněk a významnou roli v tomto pro-

cesu hrají glykokonjugáty na povrchu buněk, neboť se účastní adhesních procesů. Např. byl na povrchu plicních buněk identifikován protein vážící α -L-fukosu, u kterého se předpokládá účast na adhesi buněk šířících se z místa vzniku primárního nádoru, neboť na povrchu některých nádorových buněk byl prokázán vysoký obsah fukosy. Intenzivně je nyní studována možnost zamezení metastatického šíření aplikací specifických cukrů a glykokonjugátů. V úvahu přichází mimo jiné i L-fukosa nebo fukoidan. Jejich účinkem by mělo dojít k zablokování proteinů vážících fukosu pro interakci s nádorovými buňkami⁹. Celou situaci ovšem opět komplikuje finanční stránka věci. L-Fukosa patří v současné době mezi poměrně drahé chemikálie a stejně tak výroba různých derivátů obsahujících fukosu není zatím dokonale vyřešena. Tím se opět potvrzuje význam testování různých způsobů získávání fukosy a jejich sloučenin².

6.5. Záněty

V zánětlivých procesech hraje důležitou roli tetrasacharid Sialyl Lewis X (SLeX). Jde o komplexní molekulu vyskytující se na povrchu leukocytů, složenou ze čtyř specificky k sobě vázaných sacharidů – sialové kyseliny, D-galaktosy, N-acetyl-D-glukosaminu a L-fukosy (obr. 3). Na tento antigen se váže specifický protein selektin, který je při porušení tkáně produkován na povrchu cév jako signál o poškození. Dochází k expanzi cév a k přechodu bílých krvinek do místa porušení tkáně. Stejný mechanismus komplikuje například operace zahrnující transplantace orgánů, neboť velké množství bílých krvinek je schopno zničit i nově implantovaný zdravý orgán. Řešením by mohla být aplikace SLeX do krevního řečiště, čímž by se zablokovala možnost vazby selektinu na SLeX bílých krvinek a tedy se skryl signál o porušení tkáně. Stejně tak se předpokládá, že aplikace struktur podobných SLeX by mohla být užitečná při léčbě nádorů šířících se metastaticky. Chemická syntéza této sloučeniny je velmi nákladná, v současnosti již ale byly vyvinuty i méně finančně náročné enzymové způsoby přípravy².

6.6. Syndrom LAD

Jako syndrom LAD (leukocyte adhesion deficiency) je označována vzácná metabolická choroba, při které dochází k poruchám produkce proteinu CD18, který je nezbytný pro migraci bílých krvinek do místa poranění či infekce. Porucha produkce se může projevit buď jako nedostatečné množství aktivního proteinu nebo jako vznik proteinu defektního. I u této choroby byla zjištěna snížená fukosylace některých glykokonjugátů^{9,36}.

7. Závěr

Fukosidasy i samotná L-fukosa mají v živých organismech svou nezastupitelnou roli. Účastní se mnoha důležitých procesů nezbytných pro správnou funkci organismu a jejich nedostatek může být příčinou některých závažných onemocnění. Mnoho otázek týkajících se fukosidas a glykokonjugátů obsahujících L-fukosu zůstává ještě stále nezodpovězených. Není vyřešen přesný mechanismus působení jednotlivých enzymů a nejsou většinou známy aminokyseliny účastníci se katalytické reakce v aktivním centru. Z toho důvodu je důležitý i vývoj potenciálních substrátů a inhibitorů fukosidas. Ani vliv jednotlivých glykokonjugátů na lidský organismus není podrobně prozkoumán, nehledě na to, že chemická i enzymová syntéza nových strukturních typů nabízí nepřeborné množství sloučenin potenciálně využitelných v léčebných terapiích. Snaha o poznání by ovšem neměla být zaměřována pouze na lidskou α -L-fukosidasu a na glykokonjugáty obsahující L-fukosu, ale i na enzymy a sloučeniny prokaryotní, kvassinkové a rostlinné. Jejich specifické vlastnosti by totiž mohly být užitečné při syntéze různých sacharidových struktur a při vývoji nových léčebných postupů.

LITERATURA

- De Carlos A., Montenegro D., Alonso-Rodríguez A., de la Cadena M. P., Rodríguez-Berrocal F. J., Martínez-Zorzano V. S.: *J. Chromatogr.*, B 786, 7 (2003).
- Vanhooren P. T., Vandamme E. J.: *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 74, 479 (1999).
- Farkas E., Thiem J., Ajisaka K.: *Carbohydr. Res.* 328, 293 (2000).
- Berteau O., Bielicki J., Kilonda A., Machy D., Anson D. S., Kenne L.: *Biochemistry* 43, 7881 (2004).
- Tarling Ch. A., He S., Sulzenbacher G., Bignon Ch., Bourne Y., Henrissat B., Withers S. G.: *J. Biol. Chem.* 278, 47394 (2003).
- <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>, staženo 11. listopadu 2004.
- Tsuji Y., Yamamoto K., Tochikur T.: *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 928 (1990).
- <http://www.biorama.ch/biblio/b20gfach/b35bchem/b10kh/kh020.htm>, staženo 12. listopadu 2004.
- http://www.glycoscience.com/glycoscience/document_viewer.wm?FILENAME=F002, staženo 18. listopadu 2004.
- <http://www.innvista.com/health/nutrition/essensug/fucose.htm>, staženo 19. října 2004.
- Ajisaka K., Fujimoto H., Miyasato M.: *Carbohydr. Res.* 309, 125 (1998).
- http://www.eucerin.co.uk/product_info/actives.html, staženo 16. listopadu 2004.
- Cobucci-Ponzano B., Trincone A., Giordano A., Rossi M., Moracci M.: *J. Biol. Chem.* 17, 14622 (2003).
- Ruiz-Palacios G. M., Cervantes L. E., Ramos P., Chavez-Munguia B., Newburg D. S.: *J. Biol. Chem.* 278, 14112 (2003).
- Murata T., Usui T.: *Trends in Glycosci. Glycotechnol.* 12, 161 (2000).
- Koeller K. M., Wong CH.-H.: *Chem. Rev.* 100, 4465 (2000).
- <http://www.bentham.org/sample-issues/cmcaiaa1-1/flier/fig5.gif>, staženo 16. listopadu 2004.
- Matsumoto S., Nagaoka M., Hara T., Kimura-Takagi I., Mistuyama K., Ueyama S.: *Clin. Exp. Immunol.* 136, 432 (2004).
- Lee J. B., Hayashi K., Hashimoto M., Nakano T., Hayashi T.: *Chem. Pharm. Bull.* 52, 1091 (2004).
- <http://www.naturodoc.com/library/detox/U-Fucoidan.htm>, staženo 12. listopadu 2004.
- Gerber-Lemaire S., Popowycz F., Rodriguez-García E., Schütz C., Carmona Asenjo A. T., Robina I., Vogel P.: *Arkivoc.* 2002, 23.
- Gu G., Du Y., Hu H., Jin Ch.: *Carbohydr. Res.* 338, 1603 (2003).
- Asano N., Yasuda K., Kizu H., Kato A., Fan J. Q., Nash R. J., Fleet G. W. J., Molyneux R. J.: *Eur. J. Biochem.* 268, 35 (2001).
- Tite T., Lallemand M. Ch., Poupon E., Kunesch N., Tilleguin F., Gravier-Pelletier Ch., Le Merrer Y., Husson H. P.: *Bioorg. Med. Chem.* 12, 5091 (2004).
- Ogawa S., Maruyama A., Odagiri T., Yuasa H., Hashimoto H.: *Eur. J. Org. Chem.* 2001, 967.
- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=OMIM&dopt=Detailed&tmpl=dispomimTemplate&list_uids=230000, staženo 18. září 2004.
- http://my.webmd.com/hw/health_guide_atoz/nord1095.asp, staženo 18. září 2004.
- Galluzzi P., Rufa A., Balestri P., Cerase A., Federico A.: *Am. J. Neuroradiol.* 22, 777 (2001).
- Önenli-Mungan N., Özer G., Altunbaşak Ş., Besley G., Yüksel B., Topaloğlu A. K., Soyupak S.: *Türk. J. Pediatr.* 46, 170 (2004).
- http://nova.medicina.cz/verejne/clanek.dss?s_id=2079&s_rub=0&s_sv=91&s_ts=38279,3774768518, staženo 19. října 2004.
- Glick M. C., Kothari V. A., Liu A., Stoykova L. I., Scanlin T. F.: *Biochimie* 83, 743 (2001).
- Maler T., Duthie M., Riordan J. R.: *FEBS Lett.* 121, 153 (1980).
- <http://www.cfklub.cz/?pageid=1&nid=2>, staženo 19. října 2004.
- <http://www.arthritis.org/conditions/DiseaseCenter/>

ra.asp, staženo 21. října 2004.

35. <http://www.healthnowny.com/kbase/topic/special/hw86269/sec1.htm>, staženo 21. října 2004.
36. <http://www.ladinfo.org/>, staženo 27. října 2004

E. Benešová, M. Marková, P. Lipovová, and B. Králová (*Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Fucosidase and Fucose-Containing Glycoconjugates**

α -L-fucosidase, an important exoglycosidase, is involved in the metabolism of fucose-containing glycoconju-

gates. The deficiency of the enzyme causes some incurable diseases, such as fucosidosis. Fucose-containing glycoconjugates are essential, as they are involved in several processes such as inflammation, reproduction, cell-cell interaction, signal transduction, growth regulation, and ligand-receptor interaction. The knowledge of fucosidase (its active site and catalytic mechanisms) and of fucose-containing glycoconjugates is not yet complete. At present, some uncomplicated methods for synthesis of fucose and fucose-containing glycoconjugates are sought, as the compounds can find some applications in therapy of severe diseases, such as cancer. For the synthesis of fucose-containing glycoconjugates, fucosidases with the ability to catalyze transglycosylation reaction can be used.

ČERVENĚ A MODŘE ZBARVENÉ BRAMBORY – VÝZNAMNÝ ZDROJ ANTIOXIDANTŮ V LIDSKÉ VÝŽIVĚ

JAROMÍR LACHMAN^a, KAREL HAMOUZ^b
a MATYÁŠ ORSÁK^a

^aKatedra chemie, ^bKatedra rostlinné výroby, Fakulta agro-biologie, potravinových a přírodních zdrojů, Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýcká 129, 165 21 Praha 6
lachman@af.czu.cz

Došlo 7.3.05, přijato 2.6.05.

Klíčová slova: červené a modré brambory, antioxidanty, polyfenoly, anthokyaniny, šlechtění, použití v potravinářském a nepotravinářském průmyslu, fungicidní vlastnosti

Obsah

1. Úvod
2. Brambory – významný zdroj antioxidantů v lidské výživě
3. Anthokyanová barviva v barevných hlízách brambor
4. Antioxidační aktivita anthokyanů brambor
5. Význam antioxidantů brambor
6. Šlechtění nových odrůd brambor s červeně a modře zbarvenými hlízami
7. Role anthokyanů v bramborách a jejich potravinářské a nepotravinářské použití
8. Závěr

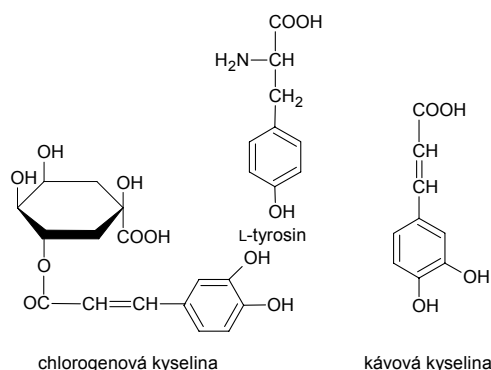
1. Úvod

Přírodní antioxidanty přítomné v potravinách a dalším biologickém materiálu vyvolaly značný zájem kvůli svým potenciálním nutričním a terapeutickým účinkům. Antioxidanty podle své chemické struktury mohou být rozděleny na polyfenoly (flavonoidy, anthokyaniny, fenolkarboxylové kyseliny a kumariny), karotenoidy (karoteny – prekursor vitamínu A a xanthofyly) a tokoferoly (vitamin E). Silnou antioxidační aktivitu má také L-askorbová kyselina (vitamin C) a selen. Antioxidanty mohou zachycovat radikály dříve, než mohou škodit a mohou bránit rozšíření oxidačnímu poškození. Bylo zjištěno, že antioxidanty zpomalují, blokují nebo zabraňují oxidačním změnám látek v lidském těle a buňkách. Polyfenolické sloučeniny, zvl. flavonoidy, jsou účinnými antioxidanty¹ díky své schopnosti zachytávat volné radikály mastných kyselin a reaktivních forem kyslíku^{2–4}. Obsah antioxidantů v potravinách zpomaluje ve značné míře aterosklerotické procesy, inhi-

buje akumulaci cholesterolu v krevním séru a zvyšuje rezistenci cévních stěn proti jejich lámavosti. Mnohé antioxidanty snižují riziko onemocnění koronárních cév tím, že zachycují a neutralizují volné radikály. Hlavními antioxidanty brambor jsou polyfenoly, L-askorbová kyselina, karotenoidy, tokoferoly, α -lipoová kyselina a selen. Zelenina, ovoce a zemědělské plodiny představují v lidské výživě významný zdroj antioxidantů jak při přímé konzumaci, tak i ve formě zeleninových a ovocných šťáv. Justesen a spol.⁵ odhadl denní příjem flavonoidů na 26 mg na osobu.

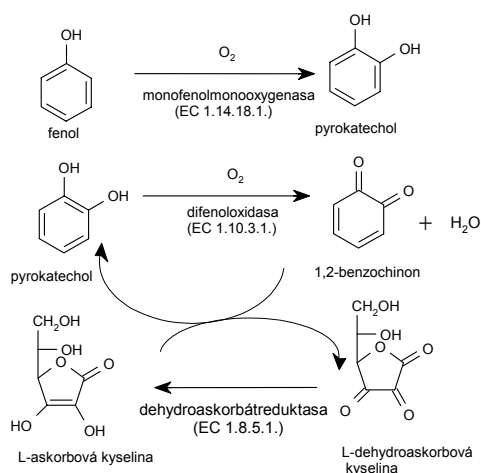
2. Brambory – významný zdroj antioxidantů v lidské výživě

Jedním z nejbohatších zdrojů antioxidantů v lidské výživě jsou bramborové hlízy (*Solanum tuberosum* L.)⁶. Hlízy brambor v lidské výživě vzhledem ke konzumovanému množství představují významný zdroj antioxidantů⁷, např. spolu s ovocem a zeleninou zajišťují denní příjem asi 64 mg polyfenolů na osobu v USA a zauímají druhé místo v přísunu antioxidantů za rajčaty⁸. Z antioxidantů jsou nejbohatší na polyfenoly (1226–4405 mg kg⁻¹) a L-askorbovou kyselinu (170–990 mg kg⁻¹). Z ostatních látek typu antioxidantů jsou v bramborách zastoupeny karotenoidy (až 4 mg kg⁻¹), α -tokoferol (0,5–2,8 mg kg⁻¹) a v menší míře selen (0,01 mg kg⁻¹) a α -lipoová kyselina. Hlízy brambor obsahují sekundární metabolity – polyfenolické sloučeniny, které jsou substráty reakcí enzymového hnědnutí bramborových hlíz, objevujícího se při jejich loupání a krájení a které je umožněno působením polyfenoloxidas⁹. Aminokyselina L-tyrosin (1–2.10⁻³ mol l⁻¹) a chlorogenová kyselina (2–6.10⁻⁴ mol l⁻¹)¹⁰ představují dominantní složky bramborových hlíz^{11,12} obsahující v molekulách

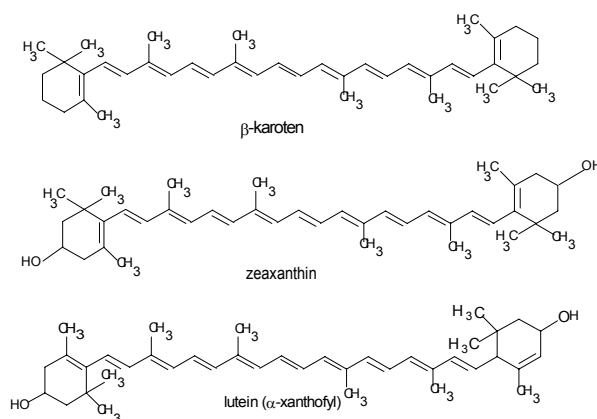


Obr. 1. Hlavní fenolické kyseliny brambor

fenolické hydroxyskupiny (obr. 1). Z těchto látek nejvíce zastoupenou sloučeninou je v bramborových hlízách aminokyselina L-tyrosin ($770\text{--}3900\text{ mg kg}^{-1}$) a dále to jsou kávová kyselina (280 mg kg^{-1}), skopolin (98 mg kg^{-1}), chlorogenová kyselina ($22\text{--}71\text{ mg kg}^{-1}$), ferulová kyselina (28 mg kg^{-1}) a kryptochlorogenová kyselina (11 mg kg^{-1}) – systematické názvy jsou uvedeny v tab. II. Kávová kyselina může být produktem hydrolýzy chlorogenové kyseliny; vykazuje silnou antioxidační aktivitu stejně jako i další hydroxyskořicové kyseliny obsažené v hlízách brambor¹³. Yamamoto a spol.¹⁴ našli kávovou kyselinu v jedlých částech brambor v množstvích $0,2\text{--}3,2\text{ mg kg}^{-1}$ a obsah celkových polyfenolů byl $422\text{--}834\text{ mg kg}^{-1}$. Slupky obsahovaly dvojnásobné množství těchto látek. Některé polyfenoly jsou zastoupeny pouze v menších množstvích, např. neochlorogenová kyselina (7 mg kg^{-1}), *p*-kumarová kyselina (4 mg kg^{-1}), sinapová kyselina (3 mg kg^{-1}) nebo kyselina isochlorogenová *a* (3 mg kg^{-1}). Pouze v malých množstvích byly nalezeny kyselina isochlorogenová *b*, skopoletin a *trans*-feruloylputrescin. Negrel a spol.¹⁵ zjistili výskyt amidů ferulové kyseliny (feruloyltyraminu a feruloyloktopaminu) ve vzorcích s vyšším obsahem suberinu v poškozeném peridermu bramborových hlíz. V celé rostlině brambor byly identifikovány glykosidy delphinidinu (3-*O*-rutinosid), kvercetin (3-*O*-glukosid nebo rutinosid), kemferol (3-*O*-glukosylglukosid)-7-*O*-rhamnosid, 3-*O*-triglukosid-7-*O*-rhamnosid a petunidinu (3-*O*-rutinosid). Z volných fenolických látek byl v bramborách identifikován (2*R*,3*S*)-katechin¹⁶. Laerke a spol.¹⁷ prokázali u odrůd Dali a Olea, že náchylnost k černým skvrnám u bramborových hlíz nemůže být dávana do relace s polyfenoloxidasovou aktivitou a koncentrací fenolů v bramborových hlízách. Sekundární struktura polyfenoloxidasu brambor s červenou dužninou (molekulová hmotnost 40 kDa) je v poslední době intenzivně studována a Jang a Song¹⁸ prokázali, že obsahuje 35 % α -helixu, 30 % β -struktury a 35 % nepravidelné spirály.



Obr. 2. Antioxidační vztah mezi L-askorbovou kyselinou a polyfenoly



Obr. 3. Hlavní karotenoidy brambor

L-Askorbová kyselina (AK) je hlavním přírodním inhibitorem enzymového hnědnutí brambor¹⁹. Redukuje primární produkty oxidace, *o*-chinony zpět na *o*-difenoly a sama je kvantitativně oxidována na dehydroaskorbovou kyselinu (obr. 2). L-Askorbová kyselina také inhibuje bramborovou polyfenoloxidasu (PPO) přímo blokováním atomu mědi v aktivním centru enzymu. L-Askorbová kyselina obsažená v hlízách přitahuje pozornost vzhledem ke svému obsahu v bramborách a podílu konzumovaných brambor v lidské výživě jako důležitý zdroj vitamínu C. Brambory jsou velmi bohaté na L-askorbovou kyselinu²⁰ – obsahují $170\text{--}990\text{ mg kg}^{-1}$. Dokonce i ve vařených hlízách brambor zůstává průměrně 130 mg askorbové kyseliny v kilogramu a v bramborách pečených v mikrovlnné troubě 151 mg v kilogramu²¹. Obsah L-askorbové kyseliny je ovlivněn spoustou vnějších i vnitřních faktorů, jako jsou odrůda, rok pěstování, způsob pěstování, podmínky prostředí, stupeň zralosti hlíz a skladovací podmínky^{22–29}. Dipierro a de Leonardis³⁰ sledovali změny v aktivitě enzymů askorbát-glutathionového antioxidačního systému během skladování hlíz brambor po 40 týdnů při $3\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $9\text{ }^{\circ}\text{C}$ ve vztahu k peroxidaci lipidů. Obsah L-askorbové kyseliny v hlízách se během skladování snižoval při obou sledovaných teplotách. Obsah dehydroaskorbové kyseliny dosáhl maxima po asi 8 týdnech a byl významně vyšší u hlíz skladovaných při $3\text{ }^{\circ}\text{C}$. Reduktasa volných askorbátových radikálů, dehydroaskorbátoreduktasa a glutathionoreduktasa, enzymy zúčastněné v procesu regenerace L-askorbové kyseliny, nebyly ovlivněny teplotou a zůstaly zcela nezměněny v průběhu skladování. Je možné dojít k závěru, že askorbátový systém se podílí na zachycování volných radikálů odpovědných za peroxidaci lipidů přinejmenším při nízkých teplotách a v prvním období skladování.

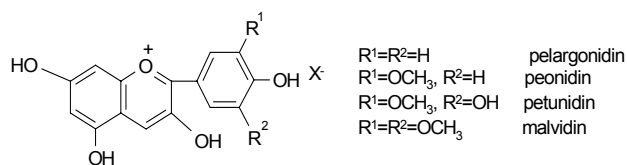
Také karotenoidy jsou účinnými antioxidanty v antioxidačním systému^{31–33}. V bramborech jsou zastoupeny průměrně v množství 4 mg kg^{-1} . Mader, Vodičková^{34,35} stanovili celkový obsah karotenoidů v 35 českých odrůdách brambor v rozmezí $0,16$ až $6,36\text{ mg kg}^{-1}$ a prů-

měrnou hodnotu $1,94 \text{ mg kg}^{-1}$. van Dokkum a spol.³⁶ (1990) uvádějí průměrnou hodnotu $0,75 \text{ mg kg}^{-1}$. Podle Dukeho²⁰ nejvíce zastoupené jsou β -karoten (1 mg kg^{-1}) a jeho 5,6-monoepoxid (obr. 3). Avšak Ong a Tee³⁷ (1992) našli jako nejvíce zastoupený lutein ($0,13\text{--}0,60 \text{ mg kg}^{-1}$) a β -karoten ($0,03\text{--}0,40 \text{ mg kg}^{-1}$). Granado a spol.³⁸ stanovili u raných odrůd jako hlavní složky lutein ($0,12 \text{ mg kg}^{-1}$), zeaxanthin ($0,04 \text{ mg kg}^{-1}$) a β -karoten ($0,01 \text{ mg kg}^{-1}$). Také Heinonen a spol.³⁹ našli jako hlavní karotenoidy lutein a zeaxanthin ($0,13\text{--}0,60 \text{ mg kg}^{-1}$) a β -karoten ($0,032\text{--}0,077 \text{ mg kg}^{-1}$). Vyšší obsah těchto karotenoidů byl nalezen ve starších bramborách po skladování (v březnu) ve srovnání s novými hlízami (v srpnu), což může být vysvětleno změnami v obsahu vody. Ostatní karotenoidy byly obsaženy pouze v menším množství. Mezi nimi byly nalezeny α -karoten, 5,6-monoepoxid cis-antheraxanthinu, cis-neoxanthin, cis-violaxanthin, kryptoxanthin, 5,6-di-epoxid kryptoxanthinu a lykopen^{40,41}. Müller⁴² našel celkový obsah karotenoidů v hlízách brambor $4,5 \text{ mg kg}^{-1}$ – toto množství bylo tvořeno violaxanthinem ($1,8 \text{ mg kg}^{-1}$), antheraxanthinem (5,6-epoxidem zeaxanthinu, $1,3 \text{ mg kg}^{-1}$), luteinem ($1,0 \text{ mg kg}^{-1}$), zeaxanthinem ($0,16 \text{ mg kg}^{-1}$), neoxanthinem ($0,14 \text{ mg kg}^{-1}$), β -karotenem ($0,05 \text{ mg kg}^{-1}$) a β -kryptoxanthinem ($0,03 \text{ mg kg}^{-1}$). Jak zjistili Mader a Vodičková^{33,34} (1996, 1998), celkový obsah karotenoidů je vysoce závislý na dané odrůdě (nejvyšší obsahy byly nalezeny u odrůd Agria, Lipta, Albina, Svatava, Zlata, Korela, Tara, Nikola, Lukava a Karin). Obsah karotenoidů je silně ovlivněn ročníkem, přičemž polorané odrůdy jsou více závislé na klimatických podmínkách ve srovnání s ranými odrůdami. Jako dominantní identifikovali lutein a zeaxanthin (42–66 % plochy píku), v menším množství byl zastoupen β -karoten (1,1–3 %).

Hlízy brambor jsou také bohaté na α -tokoferol ($0,5\text{--}2,8 \text{ mg kg}^{-1}$)⁴³ a obsahují i dostatečné množství selenu ($0,01 \text{ mg kg}^{-1}$). Djuić a spol.⁴⁴ stanovili průměrný denní příjem selenu jako $29,72 \text{ mg}$ denně a příspěvek zeleniny a brambor z celkového množství byl 6,5 %. Dalším antioxidantem v bramborových hlízách typu vitaminu je α -lipoová kyselina, známá jako růstový faktor brambor. Uvnitř buněk je α -lipoová kyselina snadno redukována na dihydroliipoovou kyselinu, která likviduje škodlivé superoxidové, hydroperoxylové a hydroxylové radikály⁴⁵.

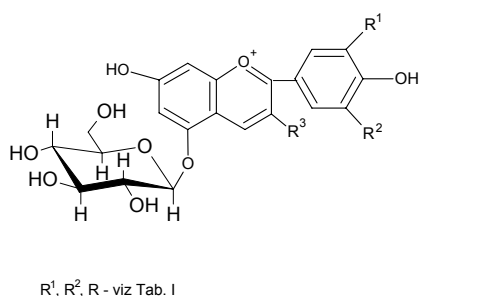
3. Anthokyanová barviva v barevných hlízách brambor

Anthokyaniny jak v čerstvém, tak i zpracovaném ovoci a zelenině zlepšují jejich celkový vzhled a také přispívají ke zdraví konzumentů⁴⁶. Důležitou vlastností těchto barviv je, že v dietě představují účinné antioxidanty^{47,48}, jejichž denní příjem je odhadován na 180 mg na osobu⁴⁹. Jsou hlavně obsaženy v červeně a modře zbarvených odrůdách brambor ve slupkách a dužnině bramborových hlíz a chrání lidský organismus proti oxidantům, volným radi-



Obr. 4. Anthokyanové aglykony brambor

kálům a vyšším hladinám LDL cholesterolu⁵⁰. Přírodní variace kultivovaných brambor zahrnuje typy, které jsou červeně a modře zbarveny díky přítomnosti anthokyanů (struktura aglykonů je uvedena na obr. 4) ve slupce nebo dužnině⁴⁷. Červeně zbarvené bramborové hlízy (slupky a dužnina) obsahují glykosidy pelargonidinu, např. 3-*O*-(*p*-kumaroylrutinosid)-5-*O*-glukosid ($200\text{--}2000 \text{ mg kg}^{-1}$ čerstvé hmoty), v menším množství glykosidy peonidinu, např. 3-*O*-(*p*-kumaroylrutinosid)-5-*O*-glukosid ($20\text{--}200 \text{ mg kg}^{-1}$ čerstvé hmoty)⁵¹. Modře zbarvené hlízy obsahují podobné koncentrace 3-*O*-(*p*-kumaroylrutinosid)-5-*O*-glukosidu petunidinu a mnohem vyšší množství 3-*O*-(*p*-kumaroylrutinosid)-5-*O*-glukosidu malvidinu (2000 až 5000 mg kg^{-1} čerstvé hmoty). Brown a spol.⁴⁷ stanovili celkový obsah anthokyanů v rozmezí 69–350 mg v kilogramu čerstvé hmoty u brambor s červenou dužninou a 55–171 mg u modře zbarvených klonů. Acylovaná barviva tvoří více než 98 % celkového obsahu anthokyanů brambor. Jednotlivé glykosidy se liší typem kyseliny, která se zúčastní acylace, např. kávová kyselina je součástí 3-*O*-{6-*O*-[4-*O*-(3,4-dihydroxycinnamoyl)- α -L-rhamnopyranosyl]- β -glukopyranosid}-5-*O*- β -glukopyranosidu peonidinu (10 % obsahu anthokyanů) a petunidinu (6 %). Naito a spol.⁵² zjistili, že acylované glykosidy pelargonidinu jsou



Tabulka I

Anthokyanové glykosidy červeně až modře zbarvených brambor

R ¹	R ²	R	Anthokyanový glykosid
H	H	H	3- <i>O</i> -{6- <i>O</i> -[4- <i>O</i> -((<i>E</i>)- <i>p</i> -kumaroyl)- α -L-rhamnopyranosyl]- β -D-glukopyranosid}-5- <i>O</i> - β -D-glukopyranosid pelargonidinu peonarin
OCH ₃	H	H	3- <i>O</i> -{6- <i>O</i> -[4- <i>O</i> -((<i>E</i>)- <i>p</i> -kumaroyl)- α -L-rhamnopyranosyl]- β -D-glukopyranosid}-5- <i>O</i> - β -D-glukopyranosid peonidinu
OCH ₃	H	OH	3- <i>O</i> -{6- <i>O</i> -[4- <i>O</i> -((<i>E</i>)-3,4-dihydroxycinnamoyl)- α -L-rhamnopyranosyl]- β -D-glukopyranosid}-5- <i>O</i> - β -D-glukopyranosid peonidinu petanin
OCH ₃	OH	H	3- <i>O</i> -{6- <i>O</i> -[4- <i>O</i> -((<i>E</i>)- <i>p</i> -kumaroyl)- α -L-rhamnopyranosyl]- β -D-glukopyranosid}-5- <i>O</i> - β -D-glukopyranosid petunidinu
OCH ₃	OH	OH	3- <i>O</i> -{6- <i>O</i> -[4- <i>O</i> -((<i>E</i>)-3,4-dihydroxycinnamoyl)- α -L-rhamnopyranosyl]- β -D-glukopyranosid}-5- <i>O</i> - β -D-glukopyranosid petunidinu
OCH ₃	OH	OCH ₃	3- <i>O</i> -{6- <i>O</i> -[4- <i>O</i> -((<i>E</i>)-feruloyl)- α -L-rhamnopyranosyl]- β -D-glukopyranosid}-5- <i>O</i> - β -D-glukopyranosid petunidinu
OCH ₃	OCH ₃	H	3- <i>O</i> -{6- <i>O</i> -[4- <i>O</i> -((<i>E</i>)- <i>p</i> -kumaroyl)- α -L-rhamnopyranosyl]- β -D-glukopyranosid}-5- <i>O</i> - β -D-glukopyranosid malvidinu
OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	3- <i>O</i> -{6- <i>O</i> -[4- <i>O</i> -((<i>E</i>)-feruloyl)- α -L-rhamnopyranosyl]- β -D-glukopyranosid}-5- <i>O</i> - β -D-glukopyranosid malvidinu

charakteristické pro červené brambory. Hlavní barvivo bylo identifikováno jako 3-*O*-{6-*O*-[4-*O*-((*E*)-*p*-kumaroyl)- α -L-rhamnopyranosyl]- β -D-glukopyranosid}-5-*O*- β -D-glukopyranosid pelargonidinu a jako minoritní barvivo 3-*O*-{6-*O*-[4-*O*-((*E*)-feruloyl)- α -L-rhamnopyranosyl]- β -D-glukopyranosid}-5-*O*- β -D-glukopyranosid pelargonidinu. V ostatních glykosidech je vázaná *p*-kumarová kyselina, např. v peonarinu (25 %) a petaninu (37 %). Stejně anthokyan, avšak v jiných poměrech, jsou obsaženy v hlízách brambor s modrou dužninou. Další acylující kyselinou je ferulová kyselina, např. v modré odrůdě Congo jsou přítomny 3-*O*-[6-*O*-[4-*O*-feruloyl)- α -L-rhamnopyranosyl]- β -D-glukopyranosid]-5-*O*- β -D-glukopyranosid petunidinu a malvidinu. Obsah anthokyanů je odhadován na 20–400 mg kg⁻¹ čerstvé hmotnosti hlíz⁵³. V červených odrůdách 3-*O*-rutinosid-5-*O*-glukosid pelargonidinu acylovaný *p*-kumarovou kyselinou představuje asi 70 % z celkového obsahu anthokyanů. Červeně zbarvené brambory obsahují převážně 80 % acylovaných glykosidů pelargonidinu, zatímco brambory s modrou dužninou obsahují kromě těchto glykosidů navíc acylované glykosidy petunidinu v poměru 2:1 (cit.⁴⁸). Struktury hlavních anthokyanových glykosidů jsou uvedeny v obr. 5 a tab. I. Glykosidy peonidinu, petunidinu a malvidinu jsou hlavní anthokyanové glykosidy, které přispívají k antioxidačním vlastnostem hlíz brambor.

4. Antioxidační aktivita anthokyanů brambor

Antioxidační aktivita anthokyanů je kromě jiných vlastností určována počtem volných fenolických hydro-

xyskupin v molekule, takže petunidin má vyšší antioxidační účinek ve srovnání s malvidinem, peonidinem či pelargonidinem. Celková antioxidační aktivita brambor způsobená polyfenoly je určena jak obsahem anthokyanů, tak i obsahem fenolických kyselin, zvláště isomery chlorogenových kyselin^{54,55}. Acylace anthokyanů brambor skořicovými kyselinami posunuje jejich zbarvení do modrého odstínu a z velké části zvyšuje jejich celkovou antioxidační účinnost. Naopak glykosylace v poloze 5 snižuje antioxidační aktivitu a rovněž tak i substituce v poloze 3. Antioxidační vlastnosti přírodních extraktů jsou mnohem vyšší ve srovnání s čistými individuálními látkami; tento jev potvrzuje jejich synergické působení^{56,57} ve směsích anthokyanů obsažených v bramborových hlízách. Zbarvené brambory vykazují dvakrát až třikrát vyšší antioxidační potenciál ve srovnání s bramborami s bílou dužninou⁴⁸. Vzhledem k této skutečnosti brambory s vysokým obsahem anthokyanů mohou být řazeny k zeleninám vykazujícím vysokou antioxidační účinnost, jako je např. kapusta nebo brokolice. Absorpce kyslíkových radikálů a redukce železitých kationtů v hlízách brambor s červeně a modře zbarvenou dužninou je několikanásobně vyšší ve srovnání s bílými hlízami brambor. Brown a spol.⁴⁸ potvrdili měřením antioxidační aktivity (metodami ORAC a FRAP – viz seznam zkratk), že brambory s červenou nebo modrou dužninou měly výrazně vyšší antioxidační aktivitu než brambory s bílou nebo žlutě či oranžově zbarvenou dužninou, avšak bílé brambory rovněž vykazují antioxidační aktivitu v rozmezí 930–1380 troloxových ekvivalentů na kg čerstvé hmoty. Brambory se tak nabízejí jako podstatný zdroj antioxidantů, které působí blahodárným způsobem

Tabulka II

Triviální a systematické názvy vybraných látek obsažených v bramborách

Triviální název	Systematický název
Ferulová kyselina	3-(4-hydroxy-3-methoxyfenyl)propenová kyselina
Chinová kyselina	1,3,4,5-tetrahydroxycyklohexan-1-karboxylová kyselina
Chlorogenová kyselina	3 <i>O</i> -(3,4-dihydroxycinnamoyl)chinová kyselina, tj. 3-[(3,4-dihydroxycinnamoyl)oxy]-1,4,5-trihydroxycyklohexan-1-karboxylová kyselina
Isochlorogenová kyselina <i>a</i>	3 <i>O</i> ,4 <i>O</i> -bis(3,4-dihydroxycinnamoyl)chinová kyselina, tj. 3,4-bis[(3,4-dihydroxycinnamoyl)oxy]-1,5-dihydroxycyklohexan-1-karboxylová kyselina
Isochlorogenová kyselina <i>b</i>	3 <i>O</i> ,5 <i>O</i> -bis(3,4-dihydroxycinnamoyl)chinová kyselina, tj. 3,5-bis[(3,4-dihydroxycinnamoyl)oxy]-1,4-dihydroxycyklohexan-1-karboxylová kyselina
Kávoá kyselina	3-(3,4-dihydroxyfenyl)propenová kyselina
Kryptochlorogenová kyselina	4 <i>O</i> -(3,4-dihydroxycinnamoyl)chinová kyselina, tj. 4-[(3,4-dihydroxycinnamoyl)oxy]-1,3,5-trihydroxycyklohexan-1-karboxylová kyselina
Neochlorogenová kyselina	5 <i>O</i> -(3,4-dihydroxycinnamoyl)chinová kyselina, tj. 5-[(3,4-dihydroxycinnamoyl)oxy]-1,4,5-trihydroxycyklohexan-1-karboxylová kyselina
Oktopamin	4-(2-amino-1-hydroxyethyl)fenol
<i>p</i> -Kumarová kyselina	3-(4-hydroxyfenyl)propenová kyselina
Sinapová kyselina	3-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyfenyl)propenová kyselina
Skopoletin	7-hydroxy-6-methoxy-2 <i>H</i> -chromen-2-on
Skopolin	7-(β-D-glukopyranosyloxy)-6-methoxy-2 <i>H</i> -chromen-2-on
Skořicová kyselina	3-fenylpropenová kyselina
Tyramin	4-(2-aminoethyl)fenol

na kardiovaskulární choroby, zabírají určitým typům rakoviny a zpomalují degeneraci sítnice⁴⁶. Dieta bohatá na anthokyaniny a ostatní příbuzné fenolické látky je spojována se sníženým výskytem a závažností některých druhů rakoviny a srdečních onemocnění⁵⁸. Jak prokázali Harada a spol.⁵⁹, acylace anthokyanů hydroxyskořicovými kyselinami je zvláště příznivá pro absorpci anthokyanů a využití jejich antioxidačních účinků.

5. Význam antioxidantů brambor

Bramborové hlízy zpracované v různých formách jako jsou smažené hranolky, lupínky, či ve formě bramborové kaše nebo pečených brambor, jsou velmi bohaté na vlákninu snižující obsah cholesterolu a draslík, který udržuje elektrolytickou rovnováhu stejně jako normální funkci srdce a krevní tlak. Jsou také bohaté obsahem antioxidantů, zvláště polyfenolů a L-askorbové kyseliny. Tyto látky jsou převážně rozpustné ve vodě. Na druhé straně hlízy brambor obsahují také lipofilní antioxidanty jako jsou karotenoidy, tokoferoly a α-lipoová kyselina. Antioxidanty jsou účinnější, jsou-li použity v kombinaci díky jejich synergickému účinku, tj. vzájemnému zvyšování účinku. Polyfenolické sloučeniny chrání vitamin C a β-karoten, které na druhé straně mohou pomáhat funkcím vitaminu E (cit.³⁸). Kromě L-tyrosinu jsou v bramborách nejvíce zastoupeny hydroxyskořicové kyseliny

(chlorogenová, neochlorogenová, kávoá, ferulová), které představují silné antioxidanty a mohou zastavit růst některých rakovinných buněk⁶⁰. Flavonoidy jsou schopné zachycovat a neutralizovat přebytké volné radikály v mnohých tkáních a působit synergicky s antioxidačními vitaminy C a E (cit.⁶¹). Některé flavonoidy jsou schopné vázat kovové ionty a zabránit jejich katalytickému působení v těle a jsou schopné regulovat aktivitu antioxidačních enzymů, superoxiddismutasy (SOD) a glutathionperoxidasy (GPX). Zvyšují účinky L-askorbové kyseliny. Anthokyaniny působí jako antioxidanty na lidský lipoprotein o nízké hustotě a na systémy lecithin-liposom⁶². Také L-askorbová kyselina může mít za určitých okolností antioxidační účinky. Může působit jako lapač kyslíku, jako donor vodíku pro fenolické sloučeniny a jako synergická látka pro některé antioxidanty. L-Askorbová kyselina redukuje některé ionty kovů a umožňuje jim působit účinněji jako prooxidanty. β-Karoten, jeden z hlavních karotenů bramborových hlíz, se vyznačuje jedním z nejvyšších antioxidačních účinků karotenoidů. α-Lipoová kyselina regeneruje jiné antioxidanty jako jsou vitaminy C a E a glutathion a prodlužuje jejich existenci v organismu. Dihydrolipoová kyselina recykluje vitamin E díky synergické reakci s L-askorbovou kyselinou. β-Karoten není aktivní při recyklaci vitaminu E, ale má schopnost chránit se sám proti oxidační destrukci⁶³. Karotenoidy jsou specifické pro ochranu určité tkáně⁶¹. Celkově jsou ochranné účinky vyšší, jsou-li ve složené směsi obsaženy všechny karotenoidy.

Karoteny také zvyšují imunitní odpověď a chrání buňky pokožky proti UV záření. Selen působí společně s vitamínem E v buněčném antioxidačním obranném systému tak, že zastavuje reakce volných radikálů, které mohou poškodit buněčné struktury.

6. Šlechtění nových odrůd brambor s červeně a modře zbarvenými hlízami

Vzhledem ke skutečnosti, že antioxidační kapacita červeně nebo modře zbarvených brambor je 2–3× vyšší ve srovnání s bramborami s bílou/žlutou dužninou, mohly by tyto brambory zvýšit příjem antioxidantů v lidské výživě. To je také důvodem, proč se úsilí šlechtitelů zaměřuje na šlechtění těchto fenotypů brambor, které mohou zahrnovat následující varianty: modrá slupka a dužnina, modrá slupka s částečně modrou (mramorovanou) dužninou, červená slupka s červenou dužninou a červená slupka s částečně zbarvenou (mramorovanou) dužninou. Syntéza anthokyanových barviv v bramborách je založena na aktivitě dihydroflavonol-4-reduktasy, která katalyzuje redukci dihydrokemferolu na leukopelargonidin. Bramborový R lokus, tj. místo speciálního genu R na chromosomu, je základním kódujícím faktorem pro dihydroflavonol-4-reduktasu, potřebnou při vzniku červených barviv brambor založených na pelargonidinu. Tento R-lokus je přítomný ve všech červeně zbarvených hlízách⁶⁴, zatímco u hlíz s bílou dužninou chybí. R-lokus byl vyšlechtěn během domestikace brambor^{65,66}. Podobně jako je R-lokus nezbytný pro tvorbu červených anthokyanů na bázi pelargonidinu, byly charakterizovány i P-lokus, nezbytný pro tvorbu modrých anthokyanů na bázi delphinidinu a I-lokus nezbytný pro tkáňovou specifickou expresi ve slupkách hlíz⁶⁷. Zvláště P-lokus je nezbytný pro kódování flavonoid-3',5'-hydroxylasy s následující tvorbou modrých anthokyanů, jak prokázali Jung a spol.⁶⁸ u odrůdy brambor s červenou slupkou Désirée. V současné době bylo vyšlechtěno mnoho zbarvených odrůd, např. Norland, Red Norland, Dark Red Norland, Congo, Blaue Hindelbank, All Blue, Red Pearl, Purple Peruvian, Russet Norkotah, Cranberry Red a další⁶⁹. Klony s červeně a modře zbarvenou dužninou mají často stejně zbarvenou slupku a tvorba těchto barviv je pravděpodobně řízena více geny^{47,70}. Procento dědičnosti potomků s červeně zbarvenou dužninou je u kříženců červená × červená 14,5 % a 4,1 % u kříženců červená × bílá. Expresí DNA kódující dihydroflavonol-4-reduktasu může zvýšit tvorbu pelargonidinu až 4×. Během vývoje barevných hlíz zůstává obsah anthokyanů více méně konstantní, pouze u méně zbarvených odrůd se zvyšuje do určitého definovaného maxima. Během vývoje těchto hlíz byly pozorovány změny v obsahu anthokyanů a zbarvení hlíz Hungem a spol.⁵⁰ nebo Fossenem a Andersenem⁷¹. Lze tedy konstatovat, že během vývoje hlíz jsou syntetizovány anthokyany a dělení buněk a nárůst přispívají potom k poklesu zbarvení a koncentrace anthokyanů.

7. Role anthokyanů v bramborách a jejich potravinářské a nepotravinářské použití

Anthokyany obsažené v červených a modrých bramborách mají antioxidační vlastnosti, ale mohou také blokovat bramborovou plíseň díky jejich fungicidním vlastnostem. Červené a modré odrůdy brambor mají trvalou rezistenci, která zabraňuje proniknutí plísně do podzemních částí brambor. Také několik dalších abiotických stresových faktorů (poranění, působení ultrafialového záření) a účinek methyl-jasmonátu nebo ethylenu byly sledovány vzhledem k jejich schopnosti indukovat akumulaci fenolických sloučenin a antioxidační kapacity v bramborách s červenou dužninou. Poranění mělo za následek zvýšení obsahu celkových fenolů o 60 % a současně 85% zvýšení antioxidační aktivity⁷². Lukaszewicz a spol.⁷³ na příkladu hlíz transgenních brambor se zvýšeným obsahem flavonoidů a anthokyanů prokázali zlepšenou antioxidační aktivitu; stejná závislost byla prokázána i pro chlorogenovou kyselinu⁷⁴. Reyes a spol.⁷⁵ potvrdili, že během zrání hlíz červených a modrých brambor roste hmotnost a výnos hlíz, avšak obsah anthokyanů a dalších fenolických látek se snižuje. Delší dny a nižší teploty byly pro tvorbu anthokyanů a fenolických látek příznivé (jejich obsah za těchto podmínek byl 1,5–2,5× vyšší). Hlavním cílem šlechtitelů a producentů při šlechtění a výběru odrůd s vysokým obsahem anthokyanů a při stanovení vhodných podmínek růstu pro zvýšení výtěžků přírodního barviva – anthokyanů je získat červené a modré brambory s vysokým obsahem anthokyanů a vysokou antioxidační aktivitou pro potravinářský průmysl a použít tyto brambory jako potravinové přísady⁴⁷. Některé tyto speciální brambory byly hodnoceny velmi pozitivně, např. odrůdy s červenou dužninou All Blue a Mc Intosh Black nebo odrůda Alaska Sweetheart⁷⁶. V poslední době jsou brambory s červeně a modře zbarvenou dužninou intenzivně studovány jako zdroj anthokyanových přírodních barviv pro potravinářské i nepotravinářské účely⁷⁷. Singh a Rajini⁷⁸ prokázali značnou antioxidační účinnost prášku vyrobeného ze slupek brambor, stejně tak i schopnost potlačit aktivitu superoxidů. Vzhledem k tomu, že bramborové slupky jsou vyhazovány jako odpad a nejsou efektivně využívány, naznačují tyto výsledky, že by mohly být efektivně využity jako složka funkčních potravin. Ur-Rehman a spol.⁷⁹ doporučují přidávat extrakt ze slupek brambor do olejů, tuků a ostatních potravinářských produktů jako přírodní antioxidant k potlačení oxidace lipidů. Acylace anthokyanových glykosidů brambor hydroxyskořicovými kyselinami přispívá k jejich značné stabilitě.

8. Závěr

Odrůdy s červenou až modrou dužninou se pěstují v Americe, v Austrálii i v některých evropských zemích, avšak většinou ve velmi malém rozsahu jako delikatesa

pro zpestření trhu. V poslední době je jim však věnována větší pozornost (např. v Kanadě, USA i v některých evropských zemích), a to právě ze zdravotních důvodů. Jsou to odrůdy s rozdílnými varnými vlastnostmi, a proto je lze využít na přípravu salátů, jako přílohu i na smažení hranolků nebo na bramborové kaše. U nás jsou tyto odrůdy zatím málo známy a v některých hypermarktech jsou jako novinka prodávány za vysoké ceny. Nelze předpokládat, že by tyto odrůdy s barevnou dužninou mohly konkurovat tradičním odrůdám. V blízké budoucnosti by však mohly zpestřit i náš trh, neboť po vstupu do EU se u nás již mohou pěstovat odrůdy registrované v ostatních zemích EU. Ve státních odrůdových zkouškách ÚKZÚZ je nyní zkoušena i odrůda tohoto typu (Valfi). Nejdůležitějšími faktory, které jsou v současné době studovány, jsou šlechtění nových odrůd a kultivarů s vysokým obsahem anthokyanů, vliv hnojení a regionu pěstování, skladovacích podmínek a technologie zpracování a stabilita produktů. Kosieradzka a spol.⁸⁰ zjistili, že hlízy transgenních brambor obsahují vyšší koncentrace anthokyanů vzhledem k expresi chalconsyntetasy, chalconisomerasy a dihydroflavonoldehydrogenasy a docházejí k závěru, že tyto hlízy s vyšším obsahem anthokyanů mohou mít vyšší nutriční hodnotu.

Seznam zkratk

I, P, R lokus – místo speciálních genů I, P, R na chromosomu

FRAP metoda (ferric reducing ability of plasma) – metoda stanovení schopnosti plasmu redukovat (tripirydyltriazin) železitý ion na železnatý

LDL cholesterol (low density lipoprotein cholesterol) – cholesterol s lipoproteinem o nízké molekulové hmotnosti, který je škodlivý

ORAC metoda (oxygen radical absorbance capacity assay) – metoda stanovení absorpční kapacity kyslíkových radikálů

troloxový ekvivalent – ekvivalent antioxidační kapacity 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylové kyseliny

ÚKZÚZ – Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

Tato studie je součástí řešení výzkumného záměru MŠM 6046070901 a grantu NAZV 1646058.

LITERATURA

- Bors W., Saran M.: Free Radical Res. Commun. 2, 289 (1987).
- Good D.: Am. J. Med. 12 (1994).
- Lachman J., Orsák M., Pivec V.: Zahradnictví 27, 65 (2000).
- Lachman J., Hejtmánková A., Orsák M., Pivec V.: Proc. Sustain Life – Secure Survival II, str. 75 (2004).
- Justesen U., Knuthsen P., Leth T.: Cancer Lett. 114, 167 (1997).
- Lachman J., Hamouz K., Orsák M., Pivec V.: Rostl. Výroba 46, 231 (2000).
- Al-Saikhan M. S., Howard L. R., Miller J. C. Jr.: J. Food Sci. 60, 341 (1995).
- Vinson J. A.: U.S. per capita polyphenol consumption from common fruits, vegetables & beverages. Am. Chem. Soc. Annual Meeting, Orlando, August 1996.
- Jang J., Song K. B.: J. Food Sci. 69, C648 (2004).
- Dao L., Friedman M.: J. Agric. Food Chem. 40, 2152 (1992).
- Matheis G.: Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm. 12, 86 (1989).
- Leja M.: Acta Physiol. Plant. 11, 201 (1989).
- Chen J. H., Ho C. T.: J. Agric. Food Chem. 45, 2374 (1997).
- Yamamoto I., Takano K., Sato H., Kamoi I., Miamoto T.: J. Agric. Sci. 41, 239 (1997).
- Negrel J., Pollet B., Lapiere C.: Phytochemistry 43, 1195 (1996).
- Mendez C. D. V., Delgado M. A. R., Rodriguez E. M. R., Romero C. D.: J. Agric. Food Chem. 52, 1323 (2004).
- Lærke P. E., Christiansen J., Veierskov B.: Postharvest Biol. Technol. 26, 99 (2001).
- Jang J., Song K. B.: J. Food Sci. 69, C648 (2004).
- Almeida M. E. M., Nogueira J. N.: Plant Foods Hum. Nutr. (Dordrecht, Neth.) 47, 245 (1995).
- Duke J. A.: Handbook of Phytochemical Constituents of Grass Herbs and Other Economic Plants. Boca Raton, FL. CRC Press 1992a.
- USDA Nutrient Database for Standard Reference Release 12 (1998).
- Mapson L. W., Swain T., Tomalin A. W.: J. Sci. Food Agric. 14, 673 (1963).
- Brudzyński A., Zawidzka-Ononiewska E.: Zesz. Nauk. Szk. Gl. Gospod. Wiejsk. – Akad. Roln. Warszawa, Technol. Rolno-Spozyw. 13, 91 (1979).
- Mondy N. I., Koch R. L., Chandra S.: J. Agric. Food Chem. 27, 418 (1979).
- Takebe M., Yoneyama T.: Nippon Dojo Hiriyogaku Zasshi 63, 447 (1992).
- Mondy N. I., Munshi C. B.: J. Agric. Food Chem. 41, 1868 (1993).
- Cieslik E.: Food Chem. 49, 233 (1994).
- Štorková J., Prugar J.: Výživa a potraviny 52, 2 (1997).
- Hamouz K., Lachman J., Vokál B., Pivec V.: Rostl. Výroba 45, 293 (1999).
- Dipierro S., de Leonardis S.: J. Exp. Bot. 48, 779 (1997).
- Canfield M.: Ann. N.Y. Acad. Sci. 691, 192 (1993).
- Järvinen R.: Int. J. Vitam. Nutr. Res. 65, 24 (1995).
- Mayne S.T.: FASEB J. 10, 690 (1996).
- Mader P., Vodičková H.: Karotenoidy v hlízách brambor vybraných odrůd českého sortimentu. Závěrečná zpráva projektu GAČR, 509/94/0736, Praha 1996.
- Mader P.: Karotenoidy v hlízách brambor vybraných odrůd českého sortimentu. Souhrn referátů XXIX. symposia o nových směrech výroby a hodnocení

- potravin. Skalský dvůr*, 8 (1998).
36. Van Dokkum W., De Vos R. H., Schrijver J.: *J. Agric. Food Chem.* 38, 211 (1990).
 37. Ong A. S. H., Tee E. S.: *Methods Enzymol.* 213, 142 (1992).
 38. Granado F., Olmedilla B., Blanco I., Rojas-Hidalgo E.: *J. Agric. Food Chem.* 40, 2135 (1992).
 39. Heinonen M. I., Haila K., Lampi A. M., Piironen V.: *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74, 1047 (1997).
 40. Bergthaller W., Tegge G., Hoffmann W.: *Effect of Storage Temperature on Color Changes and Content of Carotenoids of Dehydrated Diced Potatoes*. V knize: *Engineering for Potatoes*, (Cargill B. F., ed.) str. 456. ASAE, St. Joseph (1986).
 41. Duke J. A.: *Handbook of Biologically Active Phytochemicals and Their Activities*. FL. CRC Press, Boca Raton 1992.
 42. Müller H.: *Z. Lebensm. – Unters. Forsch. A* 204, 88 (1997).
 43. Packer L., Witt E. H., Tritschler H. J.: *Free Radical Biol. Med.* 19, 227 (1995).
 44. Djuić I., Djuić B., Trajković L.: *Naucni Skupovi – Srp. Akad. Nauka Umet., Od. Prir. – Mat. Nauka* 6, 81 (1995).
 45. Packer L., Witt E. H., Tritschler H. J.: *Free Radical Biol. Med.* 19, 227 (1995).
 46. Stintzing F.C., Carle R.: *Trends Food Sci. Technol.* 15, 19 (2004).
 47. Brown C. R., Wrolstadt R., Durst R., Yang C. P., Clevidence B.: *Am. J. Potato Res.* 80, 241 (2003).
 48. Brown C. R.: *Nutrient Status of Potato: Assessment of Future Trends*. *Proc. Washington State Potato Conf.*, 11 (2004).
 49. Galvano F., La Fauci L., Lazzarino G., Fogliano V., Ritieni A., Ciappellano S., Battistini N.C., Tavazzi B., Galvano G.: *J. Nutr. Biochem.* 15, 2 (2004).
 50. Hung Chen-Yi, Murray J. R., Ohmann S. M., Tong C. B. S.: *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 122, 20 (1997).
 51. Lewis Ch. E., Walker J. R. L., Lancaster J. E., Sutton K. H.: *J. Sci. Food Agric.* 77, 45 (1998).
 52. Naito K., Umemura Y., Mori M., Sumida T., Okada T., Takamatsu N., Okawa Y., Hayashi K., Saito N., Honda T.: *Phytochemistry* 47, 109 (1998).
 53. Rodriguez-Saona L. E., Giusti M. M., Wrolstad R. E.: *J. Food Sci.* 63, 458 (1998).
 54. Lachman J., Hamouz K., Orsák M., Pivec V.: *Rostl. Výroba* 46, 231 (2000).
 55. Hamouz K., Lachman J., Vokál B., Pivec V.: *Rostl. Výroba* 45, 293 (1999).
 56. De Souza R. F. V., De Giovani W. F.: *Redox Rep.* 9, 97 (2004).
 57. Garcia-Alonso M., de Pascual-Teresa S., Santos-Buelga C., Rivas-Gonzalo J. C.: *Food Chem.* 84, 13 (2004).
 58. Hertog M. G. L., Feskens E., Hollman P., Katan M., Kromhout D.: *Lancet* 342, 1007 (1993).
 59. Harada K., Kano M., Takayanagi T.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 1500 (2004).
 60. Cutler R. G.: *Am. J. Clin. Nutr.* 53, 373S (1991).
 61. Satué M. T., Heinonen M. I., Frankel E. N.: *J. Agric. Food Chem.* 45, 3362 (1997).
 62. Kagan V. E., Serbinova E. A., Forte T., Scita G., Packer L.: *J. Lipid Res.* 33, 385 (1993).
 63. Ziegler R.: *Am. J. Clin. Nutr.* 53, 251S (1991).
 64. De Jong W. S., De Jong D. M., De Jong H., Kalazich J., Bodis M.: *Theor. Appl. Genet.* 107, 1375 (2003).
 65. De Jong H.: *Am. Potato J.* 68, 585 (1991).
 66. De Jong H., Burns V. J.: *Am. Potato J.* 70, 267 (1993).
 67. De Jong W. S., Eannetta N. T., De Jong D. M.: *Theor. Appl. Genet.* 108, 423 (2004).
 68. Jung Ch. A. S., Griffiths H. M., De Jong D. M., Cheby S., Bodis M., De Jong W. S.: *Theor. Appl. Genet.* 110, 269 (2005).
 69. Groza H. I., Bowen B. D., Kichefski D., Peloquin S. J., Jiang J.: *Am. J. Potato Res.* 81, 209 (2004).
 70. Jong W. S., De Jong D. M., Bodis M.: *Theor. Appl. Genet.* 107, 1384 (2003).
 71. Fossen T., Andersen O. M.: *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 75, 360 (2000).
 72. Reyes L. F., Cisneros-Zevallos L.: *J. Agric. Food Chem.* 51, 5296 (2003).
 73. Lukaszewicz M., Matysiak-Kata I., Skala J., Fecka I., Cisowski W., Szopa J.: *J. Agric. Food Chem.* 52, 1526 (2004).
 74. Niggeweg R., Michael A. J., Martin C.: *Nat. Biotechnol.* 22, 746 (2004).
 75. Reyes L. F., Miller J. C., Cisneros-Zevallos L.: *Am. J. Potato Res.* 81, 187 (2004).
 76. Sorensen E. J., Mikitzel L. J.: *An Evaluation of the Culinary Quality of Specialty Potatoes*. *Proc. 1993 Washington State Potato Conf. & Trade Fair*, 7 (1993).
 77. Vogel R., Schüler K., Flamme W., Jansen F.G., Junghans H., Christiansen Ch., Möhring H., Jacobs R.: *Investigations of extraction of pigments from potatoes (Solanum tuberosum genpool) and testing of economic utilizability in them contained pigments for non-food utilization*. Final Report, FNR FKZ, 98NR113, Landesumweltamt Brandenburg 2004.
 78. Singh N., Rajini P. S.: *Food Chem.* 85, 611 (2004).
 79. Ur-Rehman Z., Farzana H., Shah W. H.: *Food Chem.* 85, 215 (2004).
 80. Kosieradzka I., Borucki W., Matysiak-Kata I., Szopa J., Sawosz E.: *J. Anim. Feed Sci.* 13, 87 (2004).

J. Lachman^a, K. Hamouz^b, and M. Orsák^a
^{(^aDepartment of Chemistry, ^bDepartment of Plant Production, Faculty of Agrobiological, Food and Natural Resources, Czech Agricultural University, Prague): **Red and Purple Potatoes – A Significant Antioxidant Source in Human Nutrition**}

Potatoes are a significant antioxidant source in human nutrition. The main potato antioxidants are polyphenols.

nols, L-ascorbic acid, carotenoids, tocopherols, α -lipoic acid, and selenium. Major phenolic constituents in potatoes are amino acid L-tyrosine, and polyphenolic antioxidants scopolin and caffeic, chlorogenic, cryptochlorogenic and ferulic acids. Red and purple potatoes contain anthocyanins acylated with hydroxycinnamic acids (such as ferulic and caffeic acid). Pigmented potatoes show a higher antioxidant potential than white-flesh potatoes. Red potato tubers contain glycosides of pelargonidin and

peonidin, purple potatoes glycosides of malvidin and petunidin. New red- and purple-flesh potato varieties are introduced due to their higher antioxidant contents and their use in food and non-food industry. Anthocyanins of potatoes are also useful in protection against potato blight. The most important topics studied are breeding of new varieties and cultivars with high anthocyanin contents, effects of fertilisation and cultivation region, storage and technology of processing, and stability of products.

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

OBSAH RESVERATROLU V ZELENINĚ A OVOCI

IRENA KOLOUCHOVÁ^a, KAREL MELZUCH^a,
JAN ŠMIDRKAL^b a VLADIMÍR FILIP^b

^a Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, ^b Ústav technologie mléka a tuků, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5 166 28 Praha 6
irena.kolouchova@vscht.cz

Došlo 13.4.04, přepracováno 8.7.04, přijato 26.10.04.

Klíčová slova: resveratrol, zelenina, ovoce, antioxidanty, stanovení polyfenolů

Úvod

Polyfenolové sloučeniny představují významnou část sekundárních rostlinných metabolitů, které se běžně vyskytují u vyšších rostlin. Zvláště flavonoidy jsou účinnými antioxidanty díky své schopnosti reagovat s volnými radikály mastných kyselin a kyslíku.

Resveratrol (3,4',5-trihydroxystilben) je přírodně se vyskytující fytoalexin produkovaný některými rostlinami klasifikovanými jako spermatofyty jako odpověď na biotický a abiotický stres, např. napadení patogeny, UV záření, expozice ozónem nebo mechanické poškození^{1–5}. Resveratrol byl nalezen ve více než 72 rostlinných druzích, z nichž řada se uplatňuje i v lidské výživě^{6,7}. Při podrobnějších výzkumech byl nalezen např. v révě vinné, podzemnici olejné, v mnoha léčivých rostlinách⁸ a dalších.

Přípravky obsahující resveratrol byly využívány odevádána v japonské lidové medicíně (Kojo-kon) k léčbě opáření a spálenin, zánětlivých onemocnění (plísňových, bakteriálních), k léčbě aterosklerosy, poruch metabolismu tuků a pro celou řadu dalších terapeutických účelů^{9–12}. Jedním z nejbohatších zdrojů je plevelná rostlina *Polygonum cuspidatum*, běžně se vyskytující v Asii, jejíž extrakty z kořenů hrají důležitou roli v orientální medicíně. Chemopreventivní účinky resveratrolu souvisí s inhibicí hydroperoxidasy a cyklooxygenasy, jejichž aktivita je spojena s iniciací nádorového bujení, a také se snižováním hladiny cholesterolu v krvi^{3,10,13–15}.

Většinu chronických onemocnění (včetně srdečních) a mnoho typů rakoviny lze nepřímo ovlivnit konzumací potravin s antioxidantními vlastnostmi, včetně vitamínů C, E a β -karotenu. Potravin y rostlinného původu (např. zelenina, ovoce) jsou významným zdrojem antioxidantů a polyfenolových sloučenin, které se v organismu podílejí na

omezení oxidačních reakcí s možnými nepříznivými důsledky¹⁶.

Většina literatury se zabývá stanovením resveratrolu a vybraných antioxidantů ve vínech^{17–19}, hroznech, případně slupkách nebo semenech hroznů^{5,20} a jen malá část se zabývá jejich obsahem v ostatních zdrojích např. v brusinkách²¹ a v pohance²². Mezi rostliny pozitivně testované na resveratrol můžeme řadit i ovoce a zeleninu (cibule, listová zelenina), čaj, moruš apod⁷. Resveratrol byl prokázán také v kořeni arašídů (*Arachis hypogaea*), v arašidech samotných a v arašidových produktech^{23,24}. Pražené arašidy obsahovaly nižší množství resveratrolu a vyšší obsah byl ve vařených arašidech²⁴.

Cílem práce bylo stanovit obsah resveratrolu a dalších vybraných fenolových látek v zelenině, arašidech a ovoci běžně dostupném v České republice. Byl stanovován obsah celkových polyfenolických látek (TP) a polyfenolů typu pyrokatecholu, resorcinolu a floroglucinu (CRP). Tyto markery odráží antioxidační aktivitu vzorků. Resveratrol a kvercetin byly stanovovány HPLC s elektrochemickou detekcí.

Experimentální část

Resveratrol

trans-Resveratrol v krystalické podobě (v čistotě větší než 99 %) byl připraven totální syntézou²⁵. Standardní roztok *trans*-resveratrolu (10 mg l⁻¹) v 40 % v/v vodném ethanolu byl uchováván v temnu, při 4 °C. *cis*-Resveratrol byl získán 10 h expozicí roztoku *trans*-resveratrolu ve vodném ethanolu rozptýlenému dennímu světlu. Za těchto podmínek 80 % *trans*-resveratrolu isomerovalo na *cis*-isomer.

Kvercetin

Standardní roztok kvercetinu (Sigma, USA) o koncentraci 25 mg l⁻¹ v 40 % v/v vodném ethanolu byl uchováván při 4 °C.

Stanovení resveratrolu a kvercetinu

Trans- a *cis*-resveratrol a kvercetin byly stanovovány pomocí přístroje pro HPLC (3500, TSP, USA) s použitím elektrochemického detektoru HP 1049 s pracovní elektrodou ze skelného uhlíku (Hewlett-Packard, USA) při potenciálu 0,75 V. Extrakty byly filtrovány přes mikrofiltr (0,2 μ m, Millipore, U.S.A.) a permeát (20 μ l) byl nastříkovan na kolonu Nucleosil (Supelco, USA) 120-5-C18 (250 $\times$ 4 mm, 5 μ m) s předkolonou (10 $\times$ 4 mm) se stejnou stacionární fází. Byla použita isokratická eluce (mobilní fáze obsahovala: 25 % acetonitrilu, 0,1 % H₃PO₄ a NaCl (*c* = 5 mmol l⁻¹)) s průtokem 1,0 ml min⁻¹. Identifikace a kvanti-

fikace resveratrolu a kvercetinu byla prováděna metodou standardního přidavku.

V z o r k y

Byly analyzovány vzorky zeleniny, arašídů a ovoce běžně dostupné na trhu v ČR. Šlo o vzorky čínské zeli, bílého a červeného zeli, květáku, růžičkové kapusty, kapusty, brokolice, česneku, žluté a červené cibule, čekanky, hlávkového, ledového salátu a salátu Lollo Rosso, špenátu, mrkve, petržele, červené řepy, podzemnice olejné, višně obecné, maliníku, ostružiníku, aronie černé, jeřábu moravského, borůvky, černého a červeného rybízu a angreštu.

Extrakce rostlinných materiálů

Čerstvé vzorky zeleniny, ořechů a ovoce byly po rozmělnění extrahovány v 80 % (v/v) ethanolu (za studena) po dobu 24 hodin. Poměr rostlinného materiálu k přidatému extrakčnímu roztoku byl 1:3. Extrakce byla prováděna ve tmě a kapalná fáze byla po extrakci separována od tuhé filtrací (0,2 μ m, Millipore, U.S.A.). Získaná data byla přepočítána na sušinu původního vzorku.

Výsledky

Opakovatelnost, linearita, detekční limit analytu

Opakovatelnost byla stanovena metodou opakovaného nástřiku standardních roztoků *trans*-resveratrolu (10 mg l⁻¹) a kvercetinu (25 mg l⁻¹) za vybraných optimálních podmínek. Relativní standardní odchylka (RSD) byla pro *trans*-resveratrol 1,78 % pro výšku píku a 1,42 % pro retenční čas (13,5 min, *n* = 9) a pro kvercetin byla RSD 2,05 % pro výšku píku a pro retenční čas 1,45 % (24,1 min, *n* = 9).

Pro stanovení linearit metody, byla testována koncentrační řada *trans*-resveratrolu od 10 μ g l⁻¹ do 10 mg l⁻¹ a kvercetinu od 50 μ g l⁻¹ do 25 mg l⁻¹. Kalibrační křivka *trans*-resveratrolu vykazovala linearitu v celém koncentračním rozsahu s korelačním koeficientem 0,9997 a kalibrační křivka kvercetinu vykazovala linearitu v koncentračním rozmezí 50 μ g l⁻¹ až 15 mg l⁻¹ s korelačním koeficientem 0,9986. Detekční limit *trans*-resveratrolu byl 8 μ g l⁻¹ a kvercetinu 35 μ g l⁻¹ (3 S/N).

V ý t ě ů n o s t

Výtěžnost a reprodukovatelnost stanovení za optimálních podmínek byla provedena vyhodnocením přesnosti a správnosti metody. Správnost metod byla ověřena Studentovým t-testem. Výsledky ukázaly, že na hladině významnosti 95 % poskytují metody správné výsledky. Výtěžnost stanovení *trans*-resveratrolu a kvercetinu ve vzorcích zeleniny, zeleného čaje, chmele a ořechů za optimálních podmínek byla stanovena metodou standardního přidavku (*n* = 5). Relativní standardní odchylka (RSD) ve všech reálných vzorcích u *trans*-resveratrolu i kvercetinu při *n* = 5 byla v rozmezí 1,1–2,1 %.

A n a l ý z a v z o r k ů

Ve všech analyzovaných vzorcích zeleniny byla zaznamenána alespoň stopová množství resveratrolu (tab. I). Větší množství obsahovaly červená řepa a červená cibule a nejvyšší koncentrace byla stanovena u špenátu (až 0,02 mg/g_{suš}). Stanovené hodnoty se pohybovaly v rozmezí 0,005 až 0,02 mg/g_{suš}. Stanovené koncentrace kvercetinu se pohybovaly od stopových množství do 0,76 mg/g_{suš}, tato maximální koncentrace byla zjištěna u vzorku hlávkové kapusty. Většina hodnot se pohybovala od 0,02 do 0,14 mg/g_{suš}. Nejmenší obsah analyzovaných látek byl kromě vzorku ledového salátu zjištěn také u česneku, u nichž stanovené koncentrace resveratrolu i kvercetinu byly podprůměrné. Bylo zjištěno, že z hlediska obsahů celkových polyfenolů (TP) se hodnoty pohybují v rozmezí 5 mg/g_{suš} (mrkev) a 30 mg/g_{suš} (červené zeli), u látek typu pyrokatecholu, resorcinolu a floroglucinu (CRP) v rozmezí 0,02 (mrkev) až 0,08 mg/g_{suš} (červená řepa a petržel).

U burských oříšků bylo zjištěno, že koncentrace resveratrolu v analyzovaných vzorcích ořechů byla celkově nižší (tab. II). Nalezené hodnoty se pohybovaly mezi 0,002 a 0,0015 mg/g_{suš}. Větší množství resveratrolu sice bylo nalezeno v červenohnědých slupkách, ale ani tato koncentrace nepotvrdila očekávané hodnoty²⁵. Nejvyšší obsah

Tabulka I

Nalezený obsah resveratrolu a kvercetinu ve vzorcích zeleniny (mg/g_{suš})

Zelenina	Resveratrol			Kvercetin
	<i>trans</i> -	<i>cis</i> -	celkem	
Čínské zeli	0,0092	stopy ^a	0,0092	0,073
Bílé zeli	0,0076	stopy ^a	0,0076	0,12
Červené zeli	0,011	0,0041	0,015	0,14
Květák	stopy ^a	stopy ^a	stopy ^a	0,031
Růžičková kapusta	0,015	stopy ^a	0,015	0,10
Kapusta	0,0035	0,0035	0,0070	0,76
Brokolice	0,010	0,0046	0,015	0,040
Česnek	0,0021	0,0016	0,0040	0,023
Žlutá cibule	stopy ^a	stopy ^a	stopy ^a	0,040
Červená cibule	0,0038	0,0034	0,0070	0,034
Čekanka	0,012	stopy ^a	0,012	stopy ^a
Salát hlávkový	stopy ^a	stopy ^a	stopy ^a	stopy ^a
Ledový salát	stopy ^a	stopy ^a	stopy ^a	stopy ^a
Salát Lollo Rosso	0,0068	stopy ^a	0,0070	0,043
Špenát	0,010	0,0061	0,016	0,038
Mrkev	0,0038	stopy ^a	0,0040	0,030
Petržel	stopy ^a	0,0047	0,0047	0,064
Červená řepa	0,0075	stopy ^a	0,0075	0,017

^a Hodnota pod mezí stanovitelnosti

Tabulka II

Nalezený obsah resveratrolu a kvercetinů ve vzorcích burských oříšků (mg/g_{suš})

Část	Resveratrol			Kvercetin
	<i>trans</i> -	<i>cis</i> -	celkem	
Jádro	0,0004	0,0020	0,0024	0,023
Vnější slupka	0,0079	0,0014	0,0092	0,11
Skořápka	0,012	0,0028	0,015	5,9

Tabulka III

Nalezený obsah resveratrolu a kvercetinů v ovoci (mg/g_{suš})

Ovoce	Resveratrol			Kvercetin
	<i>trans</i> -	<i>cis</i> -	celkem	
Višeň obecná	0,0060	stop ^a	0,0060	0,0065
Maliník obecný	stop ^a	stop ^a	stop ^a	0,0044
Ostružiník	0,0008	stop ^a	0,0008	0,022
Aronie černá	0,031	0,0011	0,032	0,035
Jeřáb moravský	0,0009	stop ^a	0,0009	0,011
Borůvka černá	stop ^a	stop ^a	stop ^a	0,0096
Černý rybíz	0,015	0,0009	0,016	0,012
Červený rybíz	0,0012	stop ^a	0,0012	0,0082
Angrešt	stop ^a	stop ^a	stop ^a	0,0035

^a – Hodnota pod mezí stanovitelnosti

resveratrolu byl obsažen v dřevitých skořápkách ořechů, což bylo naopak předpokládáno²⁴. Při srovnání nalezených hodnot kvercetinů byl zvýšený obsah opět nalezen v dřevitých skořápkách (6 mg/g_{suš}). Největší množství TP bylo v hnědočervených slupkách arašídů (3 mg/g_{suš}). Při srovnání jednotlivých částí z hlediska obsahu látek typu CRP byl největší obsah potvrzen ve vnitřních slupkách (~ 6 mg/g_{suš}).

K problematice obsahu resveratrolu v ovoci nebyl nalezen žádný odpovídající materiál, a proto naše výsledky nelze s ničím porovnat. Byly prováděny analýzy resveratrolu v bobulovém ovoci a v některých peckovinách (tab. III). Většina analyzovaného ovoce obsahovala stopová množství resveratrolu a pouze černý jeřáb (aronie) a černý rybíz měly významnější množství resveratrolu (0,032 mg/g_{suš} a 0,016 mg/g_{suš}). Z peckovin byla nejvyšší koncentrace zjištěna u višně (0,006 mg/g_{suš}), u ostatních peckovin byla nalezena stopová množství nebo množství pod mezí detekce. Bylo překvapením, že ani borůvky neměly obsah resveratrolu nad mezí stanovitelnosti.

Diskuse

Průměrné poměry mezi obsahy resveratrolu, kvercetinů, TP a CRP (zelenina, ořechy a ovoce) lze číselně vyjádřit jako 1 : 50 : 1000 : 10.

Svého druhu je prezentovaná studie jedinečná, protože porovnáním obsahů těchto látek, které se uvádějí jako významné pro lidské zdraví a prevenci chorob, se žádná z publikací nezabývala. A také předložené výsledky vyvracejí některé dávné mýty např. o obsahu polyfenolových látek v česneku, kdy se námi naměřené hodnoty jeví jako podprůměrné. Naopak ve srovnání s ostatními druhy zeleniny bylo značné množství těchto látek zjištěno např. v zelí a naťové petrželi. Nejvyšší množství resveratrolu bylo stanoveno v červeném zelí a špenátu.

LITERATURA

- Schubert R., Fischer R., Hain R., Schreier P. H., Bahnweg G., Ernst D., Sandermann H.: *Plant Mol. Biol.* 34, 417 (1997).
- Grimming B., Schubert R., Fische R., Hain R., Schreier P. H., Betz Ch., Ernst D., Sandermann H.: *Acta Physiol. Plant.* 19, 467 (1997).
- Frémont L.: *Life Sci.* 66, 663 (2000).
- Sorheeswaran S., Pasupathy V.: *Phytochemistry* 32, 1083 (1993).
- Soleas G. J., Diamandis E. P., Goldberg D. M.: *Clin. Biochem.* 30, 91 (1997).
- Arce L., Tena M. T., Rios A., Valcárcel M.: *Anal. Chim. Acta* 359, 27 (1998).
- Jang M., Cai L., Udeani G. O., Slowing k. V., Thomas C. F., Beecher C. W. W., Fong H. H. S., Farnsworth N. R., Kinghorn A. D., Mehta R. G., Moon R. C., Pezzuto J. M.: *Science* 275, 218 (1997).
- Oleszek W., Sitek M., Stochmal A., Piacente S., Pizzia C., Cheeke P.: *J. Agric. Food Chem.* 49, 747 (2001).
- Lamuela-Raventós R. M., Romero-Pérez A. I., Waterhouse A. L., de la Torre-Boronat M. C.: *J. Agric. Food Chem.* 43, 281 (1995).
- Belguendouz L., Fremont L., Linard A.: *Biochem. Pharmacol.* 53, 1347 (1997).
- Trela B. C., Waterhouse A. L.: *J. Agric. Food Chem.* 44, 1253 (1996).
- Gao L., Chu Q., Ye J.: *Food Chem.* 78, 255 (2002).
- Kawada N., Seki S., Inoue M., Kuroki T.: *Hepatology* 27, 1265 (1998).
- Romero-Pérez A. I., Lamuela-Raventós R. M., Waterhouse A. L., de la Torre-Boronat M.C.: *J. Agric. Food Chem.* 44, 2124 (1996).
- Savouret J. F., Quesne M.: *Biomed. Pharmacother.* 56, 84 (2002).
- Weisburger J.H.: *Food Chem. Toxicol.* 37, 943 (1999).
- Leško J., Kakalíková L., Bobeková V., Lešková L.: *Vinohrad* 4, 75 (1998).
- Romero-Pérez A. I., Lamuela-Raventós R. M., Waterhouse A. L., de la Torre-Boronat M.C.: *J. Agric. Food Chem.* 44, 2124 (1996).
- Lamuela-Raventós R. M., Romero-Pérez A. I., Waterhouse A. L., de la Torre-Boronat M. C.: *J. Agric. Food Chem.* 43, 281 (1995).
- Okuda T., Yokotsuka K.: *Am. J. Enol. Vitic.* 47, 93 (1996).

21. Wang Y., Catana F., Yang Y., Roderick R., van Breen R. B.: J. Agric. Food Chem. 50, 431 (2002).
22. Quian J.-Y., Mayer D., Kuhn M.: Dtsch. Lebensm.-Rundsch. 9, 343 (1999).
23. Chen R.-S., Wu P.-L., Chiou Y.-Y.: J. Agric. Food Chem. 50, 1665 (2002).
24. Sobolev V. S., Cole R. J.: J. Agric. Food Chem. 47, 1435 (1999).
25. Šmidrkal J., Filip V., Melzoch K., Hanzlíková I.: Chem. Listy 95, 602 (2001).
26. Sobolev V.S.: J. AOC Int. 78, 1177 (1995).

I. Kolouchová^a, K. Melzoch^a, J. Šmidrkal^b, and V. Filip^b (^a Department of Fermentation Chemistry and Bioengineering, ^b Department of Dairy and Fat Technology, Institute of Chemical Technology, Prague): **The Content of Resveratrol in Vegetables and Fruit**

Resveratrol and other polyphenolic compounds are currently in the limelight all over the world due to their beneficial effects on the human body. This work describes the occurrence and determination of *trans*-resveratrol, *cis*-resveratrol and quercetin in various vegetables and fruits. An HPLC method with electrochemical detection is used for the determination. The concentrations of resveratrol were found to range from trace quantities up to 0.03 mg per g of dry weight of *trans*-resveratrol and 0.006 mg/g of *cis*-resveratrol. The highest known concentration was found in red cabbage and spinach, while a surprisingly low concentration was found in garlic. The quercetin content ranged from 0.003 mg/g to 5.9 mg/g. At the same time, we determined the total contents of polyphenolics and materials of the benzenediol type: their concentrations were found to range from 2 to 550 and from 0.005 to 6 mg/g, respectively.

NOMENKLATURA A TERMINOLOGIE

KLASIFIKAČNÍ SYSTÉM LIPIDŮ

ARNOŠT KOTYK

*Fyziologický ústav Akademie věd České republiky, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4
kotyk@biomed.cas.cz*

Došlo 13.5.05, přijato 30.5.05.

Klíčová slova: mastné kyseliny, glycerolipidy, glycerofosfolipidy, sfingolipidy, steroly, prenoly, sacharolipidy, polyketidy

Kolektiv 17 autorů z různých severoamerických univerzit spolu s jednou holandskou, jednou rakouskou a dvěma japonskými připravil v dubnu 2005 souborný přehled všech známých lipidů, jemuž se dostalo pozhánání i na letošním zasedání komise IUBMB (Mezinárodní unie pro biochemii a molekulární biologii) a IUPAC (Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii) pro biochemickou nomenklaturu. Jde o podklad pro systemizaci lipidů srovnatelnou s dalšími, již existujícími, databázemi makromolekul. A budeme mít základ pro lipidomiku!

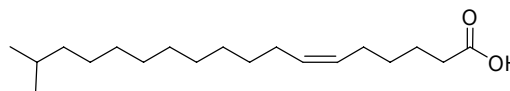
Dosavadní definice lipidů byly poměrně vágní – jsou to biologické látky většinou hydrofobního charakteru. Ve snaze o přístup rigoróznější byly lipidy definovány jako hydrofobní nebo amfipatické (či amfifilní) molekuly, vznikající buď karbaniontovou kondenzací thioesterů (mastné kyseliny, polyketidy, atp.) nebo karbokationtovou kondenzací isoprenových jednotek (prenoly, steroly, atp.). Zde navrhované kategorie lipidů zahrnují acylové deriváty mastných kyselin (v angličtině jsou to *fatty acyls*, tedy mastné acyly), dále glycerolipidy, glycerofosfolipidy, sfingolipidy, steroly, prenoly, sacharolipidy a polyketidy. V tomto systému se nevyskytují často uváděné glykolipidy, protože glykosylované lipidy jsou zařazeny do příslušných kategorií podle charakteru základního lipidu. Byla však zařazena kategorie sacharolipidů pro takové molekuly, v nichž je acylová skupina vázána přímo na cukernou kostru. Tento systém nezahrnuje ani lipoproteiny (konjugáty proteinů rozpustných ve vodě a lipidů) a proteolipidy (volně užívaný termín pro hydrofobní membránové lipidy s lipidovou částí kovalentně vázanou na některou z aminokyselin). Následuje stručný popis jednotlivých kategorií.

1. Acyly mastných kyselin (FA)

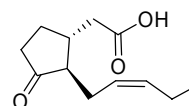
Jde o jednu ze základních a nejrozšířenějších kategorií, kterou lze rozdělit na 13 tříd a 43 podtříd. Třídy jsou tyto:

- FA01 Mastné kyseliny a jejich konjugáty
- FA02 Oktadekanoidy
- FA03 Eikosanoidy
- FA04 Dokosanoidy
- FA05 Alkoholy mastných kyselin
- FA06 Aldehydy mastných kyselin
- FA07 Estery mastných kyselin
- FA08 Amidy mastných kyselin
- FA09 Nitrily mastných kyselin
- FA10 Etery mastných kyselin
- FA11 Uhlovodíky
- FA12 Kyslíkaté deriváty uhlovodíků
- FA00 Jiné

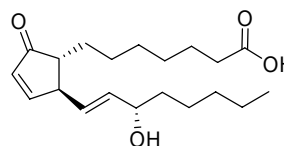
V této kategorii najdeme nejrozličnější biologicky aktivní látky, jako je lipoová kyselina, biotin, jasmonová kyselina, prostaglandiny, leukotrieny, thromboxany, lipoxiny, karnitinové estery a další. Struktura některých zástupců této kategorie je ukázána ve vzorcích 1–6.



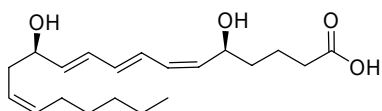
Vzorec 1. **Mastná kyselina: (6Z)-17-methyloktadec-6-en-1-ol**



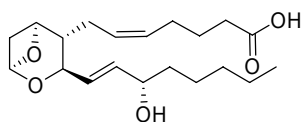
Vzorec 2. **Oktadekanoid: (1R,2R)-3-oxo-2-((Z)-pent-2-en-1-yl)cyclopentan-1-ol**



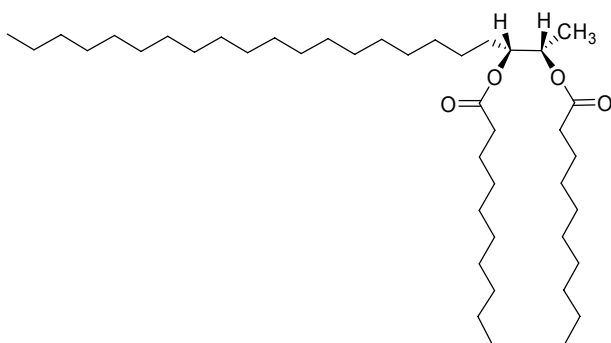
Vzorec 3. **Prostaglandin: (10Z,13E,15S)-15-hydroxy-9-oxo-prosta-10,13-dien-1-ol**



Vzorec 4. **Leukotrien: (5S,6Z,8E,10E,12R,14Z)-5,12-dihydroxykosa-6,8,10,14-tetraenová kyselina**



Vzorec 5: **Thromboxan: (5Z,9S,11S,13E,15S)-9,11-epoxy-15-hydroxythromboxa-5,13-dienová kyselina**

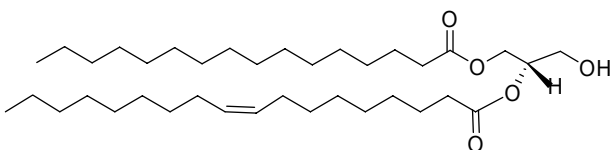


Vzorec 6. **Voskový ester: (2S,3R)-dokosan-2,3-diyl-didekanoát**

2. Glycerolipidy (GL)

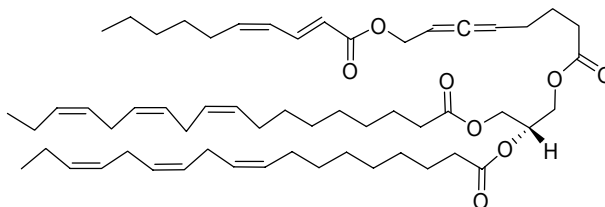
Jde o složky buněčných membrán a zásobního tuku. Rozeznáváme tu 4 třídy a 19 podtříd. Třídy jsou tyto:

- GL01 Monoradylglyceroly
- GL02 Diradylglyceroly
- GL03 Triradylglyceroly
- GL00 Jiné



Vzorec 7. **Diradylglycerol: 1-hexadecanoyl-2-((9Z)-oktadec-9-enoyl)-sn-glycerol**

Jsou tu zahrnuty i makroergické etherové glycerolipidy z archebakteriálních membrán. Zařadili bychom sem i nedávno objevené ladderanové lipidy z anaerobních bakterií oxidujících amoniak, což jsou diethery glycerolu, kde jeden ze substituentů je na alkanový řetězec navázaný cyklohexan spolu s několika cyklobutanovými kruhy. Ukázky struktury jsou ve vzorcích 7 a 8.



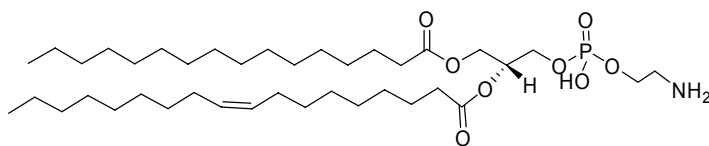
Vzorec 8. **Triradylglycerol: 1,2-di-((9Z,12Z,15Z)-oktadeca-9,12,15-trienoyl)-3-{8-(((2E,4Z)-deka-2,4-dienoyl)oxy)okta-5,6-dienoyl}-sn-glycerol**

3. Glycerofosfolipidy (GP)

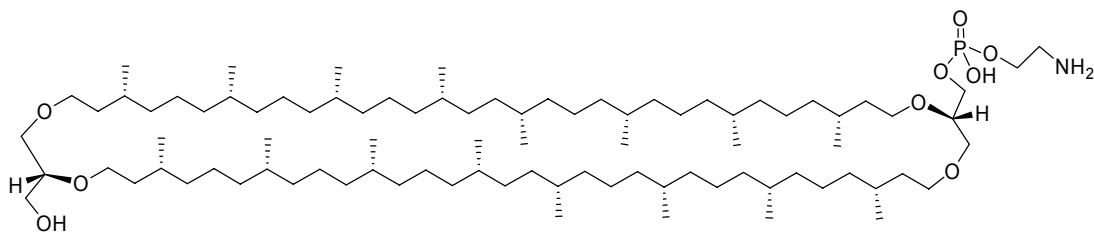
Zástupci této kategorie jsou hlavními složkami buněčných membrán. Lze je rozdělit do 21 tříd a 117 podtříd. Třídy jsou tyto:

- GP01 Glycerofosfocholinyl
- GP02 Glycerofosfoethanolaminy
- GP03 Glycerofosfoseriny
- GP04 Glycerofosfoglyceroly
- GP05 Glycerofosfoglycerofosfáty
- GP06 Glycerofosfoinositoly
- GP07 Glycerofosfoinositolmonofosfáty
- GP08 Glycerofosfoinositolbisfosfáty
- GP09 Glycerofosfoinositoltrisfosfáty
- GP10 Glycerofosfáty
- GP11 Glyceropyrofosfáty
- GP12 Glycerofosfoglycerofosfoglyceroly
- GP13 CDP-glyceroly
- GP14 Glycerofosfoglukosové lipidy
- GP15 Glycerofosfoinositolglykany
- GP16 Glycerofosfonocholiny
- GP17 Glycerofosfonoethanolaminy
- GP18 Diglyceroltetraetherové fosfolipidy (kaldarcheoly)
- GP19 Glycerolnonoltetraetherové fosfolipidy
- GP20 Oxidované glycerofosfolipidy
- GP00 Jiné

Ukázky struktury této kategorie jsou ve vzorcích 9 a 10.



Vzorec 9. **Glycerofosfoethanolamin: 1-hexadecanoyl-2-((9Z)-oktadec-9-enoyl)-sn-glycerol-3-fosfoethanolamin**

Vzorec 10. Kaldarcheol: *sn*-kaldarcheo-1-fosfoethanolamin

4. Sfingolipidy (SP)

Jde o komplexní kategorii látek, jejichž základní strukturou je sfingoidní báze, syntetizovaná ze serinu a dlouhého řetězce mastné kyseliny (resp. jejího koenzymu A).

Jsou to časté složky buněčných membrán, kde jejich cukerné substituenty mohou určovat i příslušnost k určité krevní skupině v AB0-systému. Tuto kategorii lze rozdělit do 10 tříd a 31 podtříd. Třídy jsou tyto:

SP01 Sfingoidní báze (sfingosiny)

SP02 Ceramidy

SP03 Fosfosfingolipidy

SP04 Fosfonosfingolipidy

SP05 Neutrální glykosfingolipidy

SP06 Kyselé glykosfingolipidy

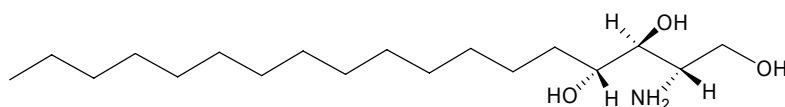
SP07 Zásadité glykosfingolipidy

SP08 Amfoterní glykosfingolipidy

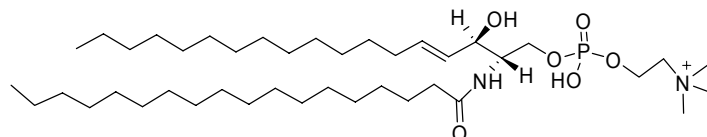
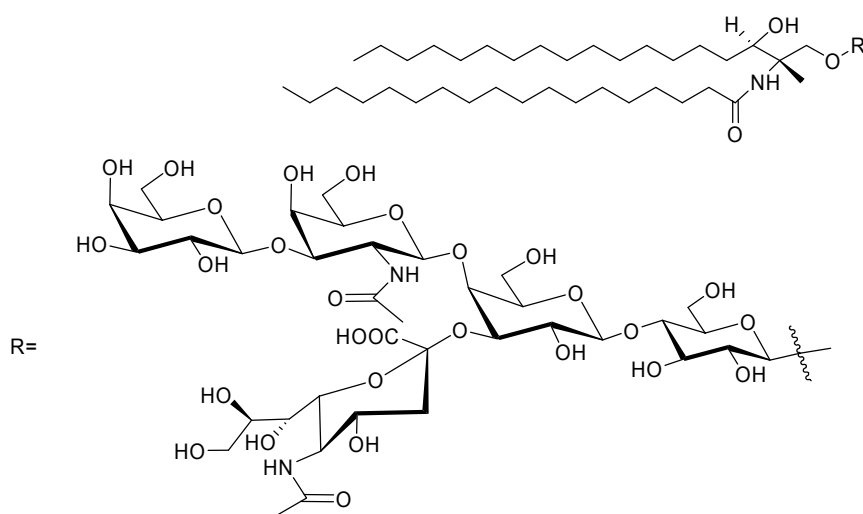
SP09 Arsenosfingolipidy

SP00 Jiné

Několik ukávek struktury sfingolipidů je ve vzorcích 11–13.



Vzorec 11. Sfingolipid: 4-hydroxysfinganin

Vzorec 12. Sfingolipid: *N*-(oktadekanoyl)sfing-4-enin-1-fosfocholinVzorec 13. Sfingolipid: β -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-GalNAc-(1 $\rightarrow$ 4)-[α -Neu5Ac-(2 $\rightarrow$ 3)]- β -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-Glc-Cer (d18:1/18:0)

5. Sterolové lipidy (ST)

Sterolové lipidy plní nejrůznější funkce. Jsou to složky eukaryontních membrán, fungují jako hormony a signální molekuly, patří sem i vitamin D nebo žlučové kyseliny.

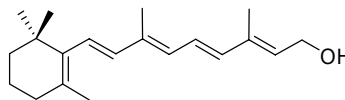
Kategorii lze rozdělit do 7 tříd a 18 podtříd. Třídy jsou tyto:

- ST01 Steroly
- ST02 Steroidy
- ST03 Sekosteroidy
- ST04 Žlučové kyseliny a deriváty
- ST05 Steroidní konjugáty
- ST06 Hopanoidy

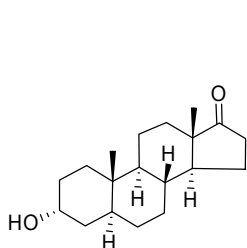
transportu oligosacharidů přes membrány a v různých glykosylačních reakcích. Rozeznáváme tu 4 třídy a 20 podtříd. Třídy jsou tyto:

- PR01 Isoprenoidy
- PR02 Chinony a hydrochinony
- PR03 Polyprenoly
- PR00 Jiné

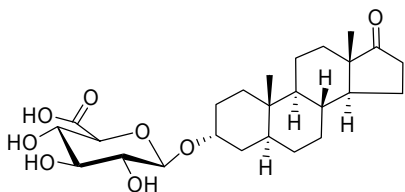
Ukázky struktur jsou ve vzorcích 17–19.



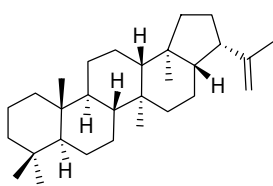
Vzorec 17. **Isoprenoid: retinol**



Vzorec 14. **Sterol: 3α-hydroxy-5β-androstan-17-on**



Vzorec 15. **Sterol: 3α-hydroxy-5α-androstan-17-on-glukuronid**



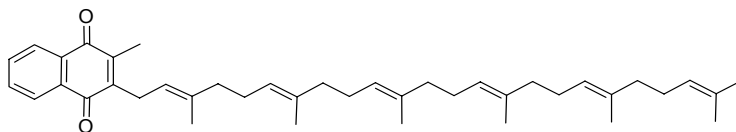
Vzorec 16. **Hopanoid: hop-22(29)-en**

ST00 Jiné

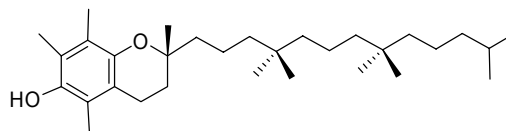
Některé struktury sterolových lipidů jsou ukázány ve vzorcích 14–16.

6. Prenolové lipidy (PR)

Prenoly se syntetizují z pětiuhlíkatých prekurzorů isopentenyl-difosfátu a dimethylallyl-difosfátu a tomu odpovídá i základní klasifikace terpenů. Hrají úlohu v



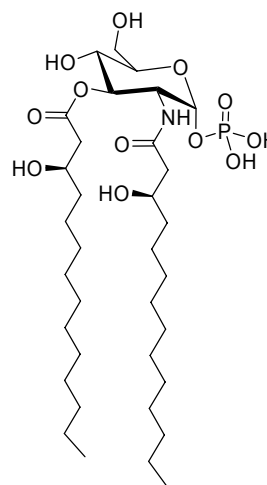
Vzorec 18. **Prenolový lipid: 2-methyl-3-hexaprenyl-1,4-naftochinon (vitamin K)**



Vzorec 19. **Prenolový lipid: (2R,4'R,8'R)-α-tokoferol (vitamin E)**

7. Sacharolipidy (SL)

V této skupině jde o látky, v nichž glycerol je nahrazen nějakým cukrem. Nejznámější z nich jsou glukosami-



Vzorec 20. **Sacharolipid: lipid X**

nové prekursory lipidu A v lipopolysacharidech gram-negativních bakterií. Rozeznáváme tu 5 tříd a 7 podtříd. Třídy jsou tyto:

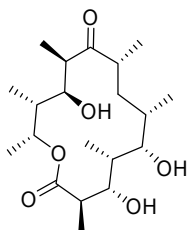
- SL01 Acylaminocukry
- SL02 Acylaminocukerné glykany
- SL03 Acyltrehalosy
- SL04 Acyltrehalosové glykany
- SL00 Jiné

Jedna typická struktura je ukázána ve vzorci 20.

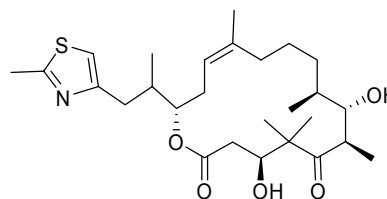
8. Polyketidy (PK)

Polyketidy jsou syntetizovány klasickými enzymy i iterativními a multimodulárními enzymy se semiautonomními aktivními místy. Mezi polyketidy patří řada antimikrobních, antiparazitických a kancerostatických látek (erythromycin, tetracykliny, nystatiny, avermektiny, epothilony). V této předběžné klasifikaci jsou zahrnuty 4 třídy:

- PK01 Makrolidové polyketidy
- PK02 Aromatické polyketidy
- PK03 Neribosomální peptido-polyketidové hybridy
- PK00 Jiné



Vzorec 21. **Polyketid: 6-deoxyerythronolid B**



Vzorec 22. **Polyketid: epothilon D**

Dvě ukázky jsou ve vzorcích 21 a 22.

Podrobnější, i když ne vždy úplné, informace na toto téma lze najít například na webových stránkách www.lipidmaps.org nebo www.chem.qmul.ac.uk/iupac.

A. Kotyk (*Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*): **Classification System of Lipids**

A new recommendation for classification of lipids was published, to be used particularly in biosciences. It consists of eight major groups, e.g. fatty acyls, glycerolipids, glycerophospholipids, sphingolipids, steroids, prenols, saccharolipids and polyketides. These groups are subdivided into a total of 69 classes and well over 200 subclasses.

STRUKTURNÍ BOHATSTVÍ A BIOLOGICKÝ VÝZNAM LIGNANŮ A JIM PŘÍBUZNÝCH ROSTLINNÝCH FENYLPROPANOIDŮ

JURAJ HARMATHA

Ústav organické chemie a biochemie AVČR, Flemingovo
nám. 2, 166 10 Praha 6
harmatha@uochb.cas.cz

Došlo 2.1.04, přepracováno 19.5.05, přijato 12.6.05.

Klíčová slova: rostlinné fenoly, polyfenoly, lignany, neolignany, norlignany, enterolignany, flavonoidy, stilbeny, stilbenoidy, fytoalexiny, fytoestrogeny, fytofarmaka, nutraceutika

Obsah

1. Úvod
2. Rostlinné fenoly, polyfenoly a fenypropanoidy
3. Lignany, neolignany, norlignany a lignin
 - 3.1. Známé biologicky účinné a klinicky využívané lignany
 - 3.2. Fytoestrogeny lignanového typu a enterolignany rostlinného původu
4. Závěr

1. Úvod

Fenypropanoidy tvoří velkou skupinu rostlinných sekundárních metabolitů, pozoruhodných svojí bohatou strukturní variabilitou a velmi širokým rozsahem biologických funkcí a účinků, a to jak v rostlině samotné, tak i v působení na jiné organismy. Chemická rozmanitost fenypropanoidů, jakož i ostatně rozmanitost všech sekundárních metabolitů rostlin, není náhodná. Je výsledkem specificky vyvinutých a řízených biogenetických drah, které se jednoznačně promítají do příslušných rostlinných metabolismů^{1,2}. Převážná většina sekundárních metabolitů je produkována jen poměrně nepočetnými metabolickými drahami, vedoucími k jednomu nebo k značně omezenému počtu klíčových metabolitů. Z nich pak vzniká velký počet derivátů a konjugátů převážně jednoduchými, ovšem také často specifickými, enzymovými transformacemi. Pozornost je zde věnována převážně běžným, ale také některým zvláštním fenypropanoidům. K jejich nejpočetnějším a zároveň i nejvýznamnějším zástupcům patří lignany, flavonoidy, kumariny, rotenoidy a stilbeny. Pro ilustraci byly zde vybrány právě lignany, které vhodně reprezentují celou velkou rodinu sekundárních metabolitů fenolického typu. K lepšímu pochopení jejich funkce a významu v rostlinách pomůže znalost jejich postavení v opravdu široké škále a struktuře sekundárních metabolitů, a to jak

z hlediska jejich chemických vlastností, tak i z hlediska jejich biologických účinků.

Sekundárním metabolitům se obvykle věnovala menší pozornost než metabolitům primárním nebo dalším ekonomicky, farmakologicky a jinak zajímavým přírodním látkám. V poslední době se ovšem zájem zvýšil i o běžné sekundární metabolity, i když nemají primární význam pro přežití samotného organismu. Mají ovšem zásadní význam pro přežití biologického druhu, a tím i pro ekologické vztahy a fylogenetický vývoj v přírodě^{3,4}.

Význam sekundárních metabolitů rostlin je komplexní a zkoumá se z různých hledisek. Jedním z velmi důležitých hledisek je právě chemická ekologie. V ní jde hlavně o chemické interakce mezi rostlinou a organismem, který je na ní závislý. Je to vztah hosta a hostitele. Hostem může být parazit nebo partner v symbióze. Někdy jde jenom o vztah konkurenta v životním prostředí. Existuje ovšem mnoho typů, a tím i mnoho zkoumaných modelů takovýchto interakcí. Nejznámějšími jsou interakce: rostlina – mikroorganismus (sem patří např. výzkum fytoalexinů) nebo rostlina – rostlina (například výzkum allelopatické účinnosti plevelů na užitkové rostliny), anebo rostlina – býložravec (obvykle jím je herbivorní hmyz).

Vztah rostlina – hmyz je vhodným modelem, kde se dá funkce sekundárních metabolitů velmi dobře a bezprostředně studovat^{3,4}. Koevoluce rostlin a hmyzu vytvořila totiž velmi rozsáhlou a složitou škálu specifických chemických interakcí. Je zřejmé, že herbivorní hmyz reaguje na velký počet chemických složek rostlin, které pak mohou indukovat různé změny v chování, jiné zase v růstu, vývoji a rozmnožování. Je to velká rozmanitost biologických účinků, ale ještě větší je rozmanitost chemických struktur, které tyto účinky způsobují. Z hlediska účinků je lze dělit do několika skupin⁵ (Tab. I).

Tabulka I

Bioaktivní rostlinné látky působící na vztahy mezi rostlinami a hmyzem

A. Regulátory chování – semiochemikálie (s účinkem informačním)

1. Kairomony – atraktanty, arestanty, stimulanty
2. Alomony – repelenty, deterenty, antinutrienty
3. Rostlinné složky a prekursorzy feromonů

B. Regulátory růstu a vývoje (s účinkem fyziologickým / farmakologickým)

1. Juvenoidy – rostlinné analogy juvenilního hormonu
2. Fytoekdysteroidy – rostlinné analogy metamorfozního hormonu
3. Chemosterilanty a antihormonální látky
4. Přírodní insekticidy a rostlinné toxiny

Z hlediska chemické struktury se v interakci mezi rostlinami a hmyzem uplatňují téměř všechny typy nízkomolekulárních přírodních látek: alifatické látky, terpenoidy, steroidy, alkaloidy, fenoly, peptidy, i mnohé jejich deriváty, nejčastěji estery, glykosidy nebo saponiny^{3–5}. Tyto deriváty nebo jiné konjugáty se stávají aktivními často až po uvolnění aktivní složky. Tak velká komplexnost struktur a vztahů umožňuje uplatnění celé šíře analytických postupů, izolačních technik, strukturně analytických metod, chemických transformací a syntéz analogů pro určení strukturně-aktivitních vztahů, pro objasnění problémů synergismu a pro odlišení vlastních nativních aktivních látek od jejich artefaktů.

2. Rostlinné fenoly, polyfenoly a fenylpropanoidy

Oprávněně se předpokládá, že úspěch vývojové adaptace rostlin na souši vděčí jejich schopnosti tvořit různorodé fenolické látky, zejména oligo- a polymerní, rovněž i kombinované s látkami jiného biogenetického původu. Právě rostlinné fenoly posloužily rostlinám jako jejich stavební, strukturní složky, a to od buněčných stěn až po jednotlivé jejich orgány. Staly se nepostradatelné též jako obranné látky (chránící před chladem, škůdci, infekcemi, mechanickým poškozením a jiným stresem⁶), signální látky (lákaající opylovače a odpuzující škůdce⁴), vonné, chuťové a barevné látky květů a plodů (podnětné pro vznik

symbiózy s jinými organismy⁷), stavební látky dřeva a kůry rostlin (pro zajištění vzrůstu, trvanlivosti a zároveň i ochrany před škůdci, slunečným zářením či vysušením⁸). Tyto a další zde neuváděné funkce rostlinných fenolů zajišťují trvalé přežívání všech typů cévnatých rostlin. I kvantitativní pohled na rostlinné fenoly je impozantní. Soudí se, že asi 40 % veškerého organicky vázaného uhlíku, cirkulujícího v biosféře, tvoří fenolické struktury, a to jak v živých rostlinných organismech, tak v jejich odumřelých, rozkládajících se částech, vytvářejících životodárnou půdu pro mnohé mikroorganismy i pro svoji vlastní reprodukci².

Rostlinné fenoly jsou obecně charakterizovány jako aromatické sekundární metabolity, které mají (nebo původně měly) jeden nebo více hydroxylů vázaných přímo na aromatickou (fenylovou) část molekuly, tudíž hydroxylů s charakteristickými „kyselými“ vlastnostmi. Tato jejich vlastnost byla, a dosud je, využívána pro jejich detekci, izolaci i chemickou transformaci. Je také zdrojem chemické reaktivity a často i biologických aktivit rostlinných fenolů. Polyhydroxylované fenoly (nyní už běžně, ovšem ne zcela přesně nazývané polyfenoly), zvláště ty s hydroxylly v *orto*- či *para*- uspořádání, jsou navíc zdrojem četných oxidoredukčních reakcí a základem pro tvorbu oligomerů, polymerů či derivátů (konjugátů) s jinými molekulami. Příkladem mohou být taniny, katecholaminy a lignin. Pojem polymerních fenolických látek není totožný s pojmem polyfenolů, který se stále častěji objevuje nejen v biologické, ale už i chemické odborné literatuře, ba i v názvech některých specializovaných vě-

Tabulka II

Nejběžnější typy fenolických látek v rostlinách seřazené podle počtu uhlíků. Modifikováno podle ^{3, 10}

Složení	Počet uhlíků	Typy fenolických látek	Příklady
C ₆	6	jednoduché fenoly, benzochinony	katechol, hydrochinon
C ₆ -C ₁	7	fenolické kyseliny / aldehydy	kyselina salicylová
C ₆ -C ₂	8	acetofenony, benzofurany	isobenzofuranon
C ₆ -C ₃	9	fenylpropanoidy, benzopyrany (kumariny)	viz obr. 7, chromen
C ₆ -C ₄	10	naftochinony	juglon, plumbagin
C ₆ -C ₅	11	ageratochromeny (prekoceny)	prekocen I, II
(C ₆) ₂	12	dibenzofurany, dibenzochinony, bifenyly	difenyleter, PCB
C ₆ -C ₁ -C ₆	13	dibenzopyrany, benzofenony, xantony	difenylmetan, fluoren
C ₆ -C ₂ -C ₆	14	stilbeny, antrachinony, fenantreny	resveratrol, emodin
C ₆ -C ₃ -C ₆	15	flavonoidy, izoflavony, chalkony, aurony	kvercetin, genistein
C ₆ -C ₄ -C ₆	16	norlignany (difenylbutadieny)	viz obr. 6, hinokiresinol
C ₆ -C ₅ -C ₆	17	norlignany (conioidy)	viz obr. 6, sugiresinol
(C ₆ -C ₃) ₂	18	lignany, neolignany	viz obr. 1, 5, 8 a 9
(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂	30	biflavonoidy	amentoflavon
(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	<i>n</i>	kondenzované taniny (flavolany)	gallotaniny, ellagitanniny
(C ₆ -C ₃) _n	<i>n</i>	ligniny	viz obr. 7
(C ₆) _n	<i>n</i>	katecholmelaniny	rostlinné pigmenty

deckých konferencí nebo společností⁹.

Polyfenoly jsou látky obsahující několik fenolických funkčních skupin na jednotlivých aromatických jádrech molekuly (někdy jen na jádře jediném). Nejběžnější typy rostlinných fenolických látek lze přehledně klasifikovat např. podle počtu uhlíků a jejich vzájemných vazeb¹⁰ (viz Tab. II). Všechny typy uvedené v této modifikované tabulce mohou tvořit polyfenoly nebo jejich methoxy-, methylenedioxy-, acyloxy- a mnoho dalších derivátů.

Většina rostlinných polyfenolů je produktem fenylylpropanové (šikimátové) a fenylylpropanoidacetátové biosyntetické dráhy^{1,2}. Mnohé z nich, především však fenylylpropanoidy, mají důležitou roli jak z hlediska chemoeckologického^{6,7,11,12}, tak i farmakologického^{9,10,13}. Proto na sebe už odedávna, a to až dodnes, poutají nemalou pozornost badatelů.

Fenylylpropanoidy velmi názorně reprezentují šíři a bohatost struktur v rámci jediného strukturního typu sekundárních metabolitů. Z hlediska účinků, jak je členěn v Tab. I, jsou fenylylpropanoidy, na rozdíl od většiny jiných, často úzce a specificky se řadících typů, široce zastoupené téměř ve všech kategoriích, od nízkomolekulárních, a tudíž těkavých atraktantů a repelentů, přes větší a polárnější molekuly potravních regulátorů (deterenty a antinutrienty), až po specifické juvenoidy a receptorové antagonisty ekdysteroidů, antihormonální látky, chemosterilanty a toxiny, anebo komplexní látky interferující s tvorbou a svlékáním hmyzí kutikuly.

Fenylylpropanoidy vznikají jen malým počtem několika základních biogenetických drah, vedoucích k omezenému počtu klíčových meziproduktů. Šikimátová dráha produkuje největší počet jejich základních strukturních typů¹⁴.

Typy (A–C)

odvozené od způsobu spojení fenylylpropanových jednotek:

- dibenzylbutanový typ (A)
- aryltetralinový typ (B)
- dibenzocyklooktanový typ (C)

Formy (I–VIII)

odvozené od stupně oxidace (I–V) a od struktury epoxidu (VI–VIII)

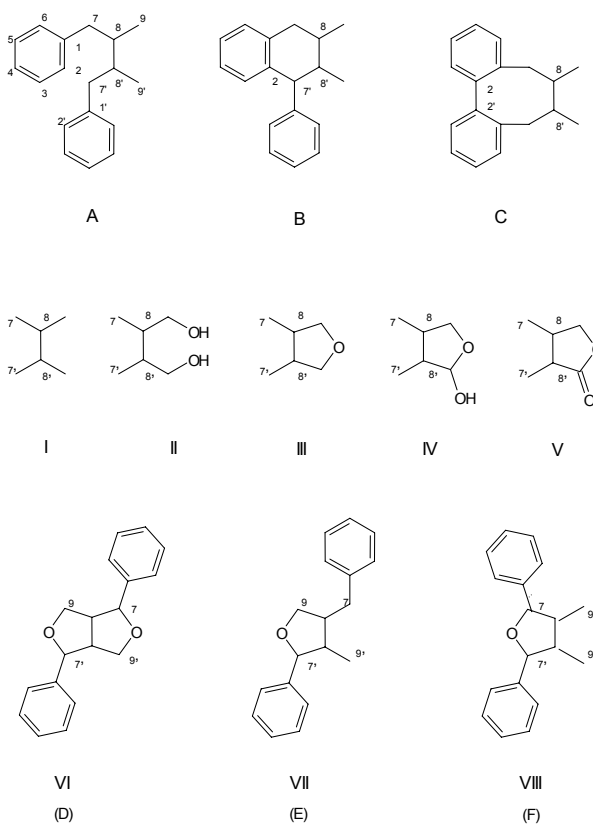
- butanová forma (I)
- butandiolová forma (II)
- 9,9'-epoxy forma (III)
- hemiacetalová forma (IV)
- butanolidová forma (V)
- bis-epoxy forma (VI)
- 7,9' / 7',9-epoxy forma (VII)
- 7,7'-epoxy forma (VIII)

Formy VI–VIII tvoří samostatné typy (D–F)

Z těch pak dále vzniká mnoho stovek až tisíců tzv. periferních derivátů, obvykle jednoduchými enzymatickými transformacemi. Z hlediska biogeneze je tudíž vznik fenylylpropanoidů odvozen od kyseliny šikimové. Základním klíčovým meziproduktem biosyntézy je pak kyselina skořicová nebo její biogenetické ekvivalenty, t.j. hydroxyderiváty: kyselina *p*-kumarová a kávová, či jejich methoxyderiváty: kyselina ferulová a sinapová^{1,15}. Z těchto klíčových látek vznikají další klíčové meziprodukty druhého stupně čtyřmi mechanismy: prodloužením propanového řetězce substitucí, prodloužením a cyklizací, zkrácením řetězce a redukcí dvojné vazby řetězce. Tyto druhoplánové metabolity se pak dále diverzifikují specifickými hydroxylacemi, metoxylacemi, dehydrogenacemi, fenoloxidacemi, esterifikacemi, glykosylacemi, radikálovými oligomeracemi apod. V případě jen jediné skupiny fenylylpropanových derivátů může tak narůst jejich počet i do stovek (např. u lignanů).

3. Lignany, norlignany, neolignany a lignin

Lignany tvoří jednu z bohatě zastoupených, biogeneticky příbuzných a tudíž i strukturně vymezených a charakteristických skupin fenylylpropanoidů¹⁶. Jejich struktura je podmíněna jejich vznikem z redukované formy základních, biogeneticky klíčových meziproduktů šikimátové



Obr. 1. Strukturní typy a formy lignanů

dráhy, t.j. z alkoholů pocházejících z kyseliny skořicové, *p*-kumárové a dalších biogenetických ekvivalentů¹⁷. Lignany jsou striktně definovány jako dimery vzniklé oxidativní dimerizací dvou fenylypropanových jednotek spojených centrálními uhlíky jejich propanových bočních řetězců v polohách C-8 a C-8' (viz struktury na Obr. 1). Propojením dalších vazeb C-C a C-O, za spoluúčasti propanových částí molekuly v různém oxidačním stupni, vznikají všechny možné strukturní typy a formy lignanů^{17,18}, přehledně znázorněné na Obr. 1.

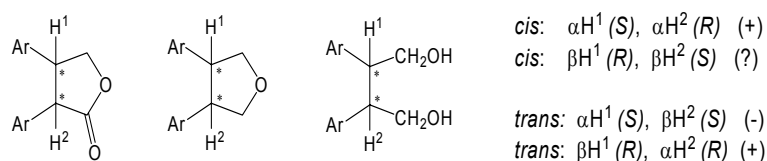
Jak je vidět na Obr. 1, tak dvě fenylypropanové jednotky spojené bočními řetězci v polohách C-8 a C-8' mohou formálně tvořit jen omezený počet strukturních typů (A až C). Další oxidace propanových jednotek a jejich následná cyklizace může vést ke vzniku hydroxy-, oxy- nebo oxoformu u každého z typů A–C. Jsou to formy: I–VIII. Je zřejmé, že formy VI–VIII mohou vznikat jenom z typu A příslušnými *mono* nebo *bis* epoxidacemi. Tyto strukturně specifické formy (VI–VII) lze vlastně považovat za samostatné typy (D–F) (cit.¹⁸). Další strukturní variabilita uvnitř jednotlivých typů a forem vzniká pak ještě zavedením jedné nebo dvou dvojných vazeb do butanové části molekuly, nebo také přítomností různého druhu a počtu substituentů (nejčastěji hydroxylů, methoxylů, methylenedioxykypin a glykosylů a jejich kombinací) na aromatické, v některých případech i alifatické části molekuly.

Následnými transformacemi lignanů se pak rozšiřuje jejich strukturní variabilita o další příbuzné struktury, jakými jsou norlignany¹⁹ nebo conioidy²⁰. Všechna jiná spojení dvou fenylypropanových jednotek pak tvoří příbuzné struktury nazývané neolignany. Biosyntéza, která kombinuje fenylypropanoidy s látkami jiného biogenetického původu (např. s terpenoidy), poskytuje takzvané hybridní lignany (nebo lignoidy) (cit.¹⁹). Celá lignanová rodina látek přesahuje už tisícovku jedinců a neustále jsou publikovány další nové látky tohoto typu.

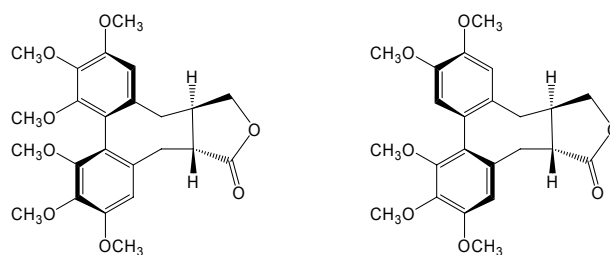
Stereostruktura lignanů

Spojení dvou fenylypropanových jednotek u lignanů typů A–C (z Obr. 1) může poskytnout čtyři stereochemické varianty (Obr. 2).

Pro lepší názornost jsou jednotlivé dvojice konfigurací (*R*) a (*S*) uvedeny také v obvyklých relativních pozicích, t.j. α (směřující pod rovinu) a β (nad rovinu nákresu). Ve skutečnosti se přírodní lignany vyskytují ve všech variantách, ovšem ve velmi rozdílném početním zastoupení²¹. Méně početnou je varianta *cis* (αH^1 , αH^2), vyznačující se kladnou molární optickou rotací²¹ a téměř výjimečnou je druhá varianta *cis* (βH^1 , βH^2)¹⁶. Nejpočetněji jsou přírodní



Obr. 2. Konfigurace sterického uspořádání vazeb uhlíků C-8 a C-8' u lignanů typu A–C



(+)-steganolide A

(-)-steganolide C

Obr. 3. Sterické uspořádání steganolidů (lignanů typu C)

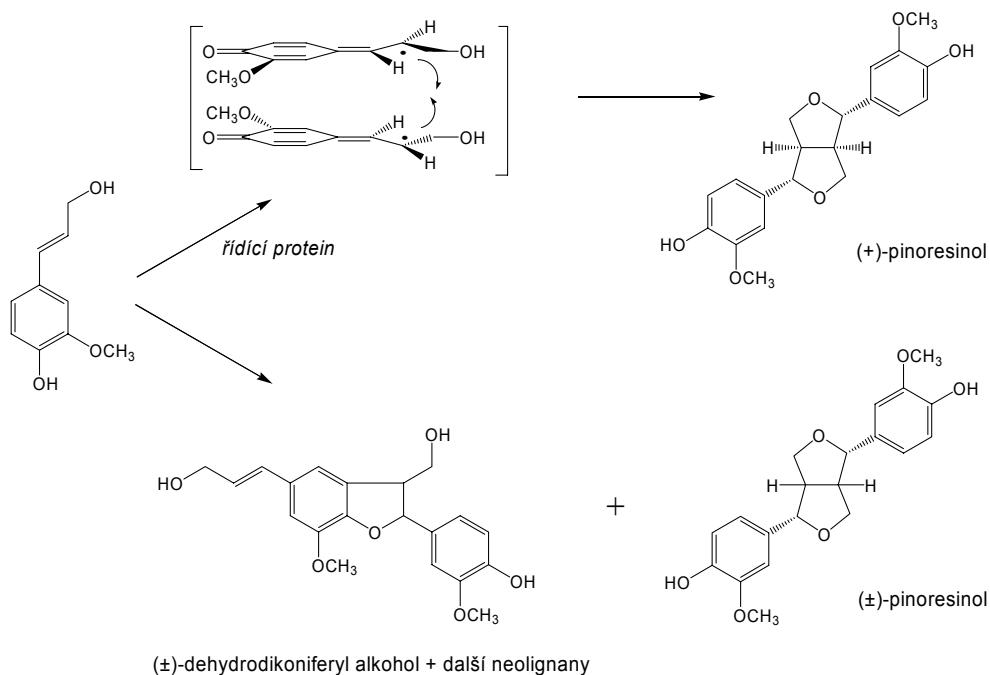
lignany zastoupeny ve variantě *trans* (αH^1 , βH^2), vyznačující se zápornou optickou rotací^{21,22}. Druhá *trans* (βH^1 , αH^2) varianta, vesměs s kladnou rotací, byla nalezena jenom v malém počtu zastoupení¹⁶. Malý nebo výjimečný počet zastoupení některých variant by mohl naznačovat, že se jedná o artefakty vzniklé při nešetrné izolaci nebo jiné manipulaci. Později však byla stereochemická diverzita lignanů objasněna tím, že mechanismus biosyntézy se různí v závislosti na orgánové specifitě, resp. specifitě enzymů (izozymů), podílejících se na stereochemickém řízení vzniku lignanů v jednotlivých orgánech rostliny²². Arylteralinový typ B (Obr. 1) má navíc ještě jedno centrum chiralit na uhlíku C-7' vzniklé spojením fenolické části jedné jednotky s alifatickou částí té druhé. Obě možné konfigurace bývají v přírodních liganech tohoto typu hojně zastoupené¹⁶.

U dibenzocyclooktanového typu C (z Obr. 1) přibývají ještě další dvě varianty stereostruktury (Obr. 3).

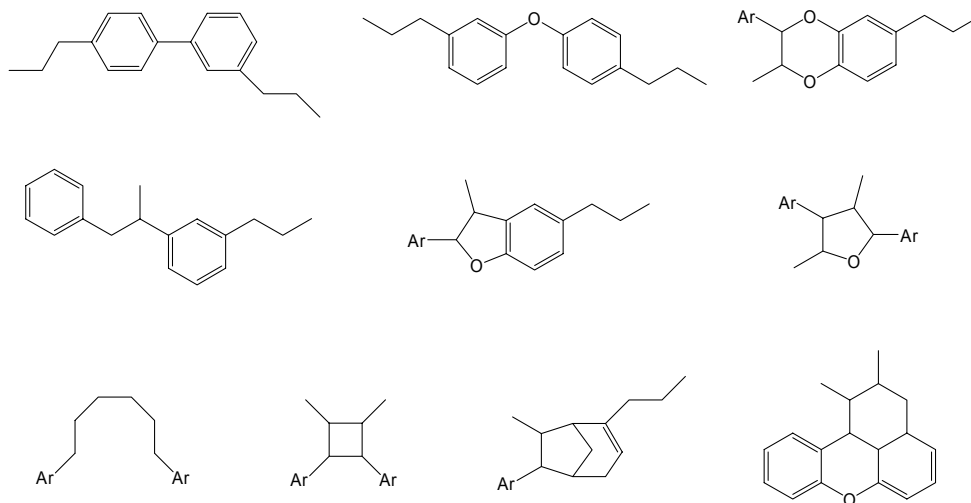
Existence a stabilita této chiralit není vyvolána jenom přítomností velkých substituentů ve vzájemně blízkých polohách (viz steganolide A), ale je vynucena poměrně rigidní konformací připojeného osmičlenného kruhu, na kterém je vázán pětičlenný lakton v pevné obálkové konformaci¹⁶. Laktonem vynucená konformace anelovaných kruhů se projevuje dokonce až u desetičlenných kruhů seskviterpenických laktonů²³. Stereochemie lignanů je velmi dobře probádaná na většině možných stereoisomerů, získaných cílenou chemickou transformací nebo stereoselektivní syntézou¹⁶.

Sterické uspořádání u typů D–F (na Obr. 1) je formálně jiné, ale principiálně navzájem si podobné. Je patrně řízené stejnými mechanismy²⁴. Rozhodujícím prvkem, který ovlivňuje vznik jen určitých stereospecifických forem, je usměrnění biosyntézy řídicím proteinem²⁵ (Obr. 4).

Tento názor vznikl právě proto, aby bylo možné vy-



Obr. 4. Řídícím proteinem usměrněná biosyntéza lignanů



Obr. 5. Výběr některých charakteristických typů neolignanů

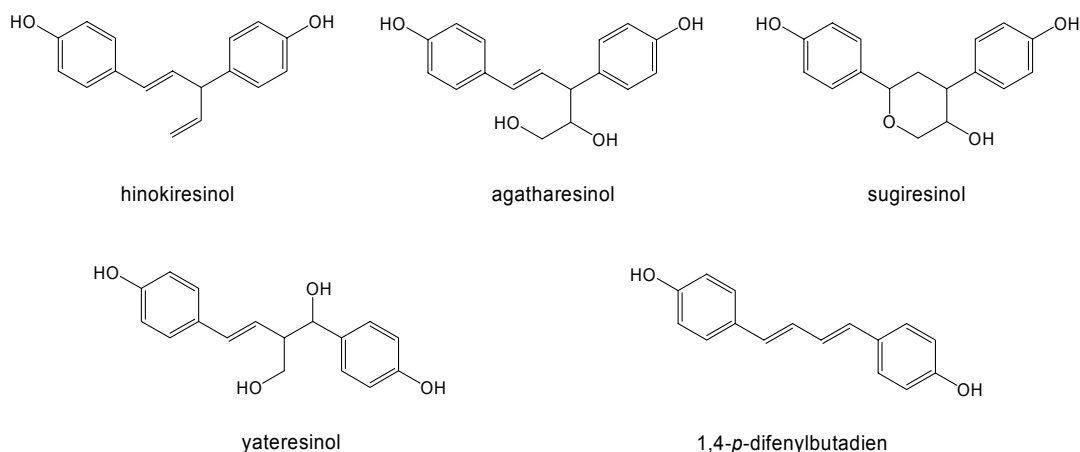
světlit situaci, že oxidací vzniklé radikály produkují jen omezené stereoformy a nikoliv všechny možné formy. Spoluúčast doplňkového řídícího proteinu umožnila nejen vysvětlit tento jev, ale ho i experimentálně potvrdit²⁶. Důkaz byl proveden tím, že za účasti takového proteinu vznikl oxidativně vyvolanou radikálovou dimerizací jenom (+)-pinoresinol (jeden z enantiomerů lignanu typu D), kdežto bez účasti řídícího proteinu vznikl racemický pino-

resinol a vedle něj i racemický dehydrodikoniferylalkohol a další neolignany. Řídící protein je tedy odpovědný nejen za stereostrukturu, ale i za samotný vznik lignanů. Jiné než lignanové spojení může být totiž důsledkem právě jen neřízených vazeb, jako např. u neolignanů nebo ligninu. Zatím není známo, jak řídící protein váže a orientuje substrát. Jeho součinnost však vysvětluje, proč vzniká jen omezené množství stereospecifických forem lignanů.

Neolignany

Všechny jiné než z definice lignanů vyplývající spojení fenylypropanových jednotek dávají možnost vzniku dimerů nejrozličnějšího typu²⁴ (Obr. 5). Je to např. přímé spojení fenylů, nebo jejich spojení skrz jednu resp. dvě etherové vazby, nebo kombinace přímé a etherové vazby, nebo vazba fenylů z jedné a bočního řetězce z druhé jednotky (a to ve všech možných polohových kombinacích), nebo spojení bočních řetězců v polohách jiných než je výhradně pro lignany definována vazba C-8 a C-8'. Tato spojení fenylypropanových jednotek výrazně rozšiřují strukturní variabilitu bis-fenylypropanoidů, a na rozdíl od již dříve definovaných lignanů, byly nazvány neolignany²⁷.

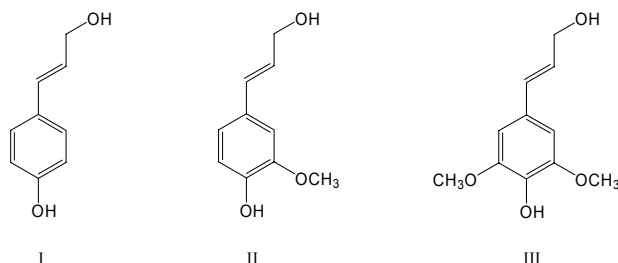
V kombinaci s redukcí vazeb a cyklizací mohou vznikat ještě varianty, jejichž původní fenylypropanové jednotky lze odhalit jen pozorným rozбором struktury (viz poslední dva příklady na Obr. 5). Z toho vyplývá, že neolignanů by mohlo být v přírodním materiálu mnohem víc než lignanů. Zatím tomu tak není. Může to být tím, že neregulovaných biosyntetických drah je méně než těch regulovaných. Může to být také jen určitým zpožděním ve výzkumu neolignanů, jejichž rutinní strukturní analýzu umožnily až dokonalejší strukturně analytické metody posledních dvou dekad. Jejich biologické účinky oproti účinkům lignanů jsou zatím také méně probádané²⁸.



Obr. 6. Nejznámější norlignany (conioidy) odvozené od kyseliny plikatinové

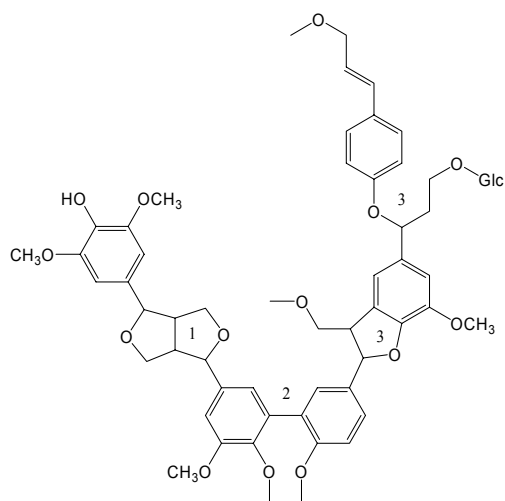
Základní fenylypropanové jednotky ligninu:

- *p*-kumaroylalkohol (I)
- konyferylalkohol (II)
- sinapylalkohol (III)



Charakter vazeb fenylypropanových jednotek tvořících základní skelet ligninu:

1. propan - propan (lignanový typ)
2. fenyl - fenyl (neolignanový typ)
3. propan - fenyl (neolignanový typ)



Obr. 7. Složky a vazby ligninů

Norlignany

Norlignany jsou sice svojí strukturou formálně více podobné neolignanům, biogeneticky jsou ovšem příbuzné lignanům¹⁹. Jsou to vlastně jejich deriváty s nižším počtem uhlíků a s různým počtem dalších, někdy i konjugovaných dvojných vazeb (Obr. 6). Biosyntéza norlignanů zatím není zcela objasněna²⁹. Tyto látky však vznikají v procesu utváření jádrové části dřevin a také se generují při vadnutí, zasychání či poškozování jejich bělové části³⁰. Mechanismus jejich vzniku předpokládá dodatečně nebo paralelně probíhající dekarboxylace a přesmyky v procesu tvorby nebo degradace lignanů²⁰.

Lignin

Mimo dimerizace fenylypropanových jednotek mohou ovšem probíhat i jejich oligomerace spolu s dalšími přidruženými reakcemi³¹. U takto vzniklých spojení se uplatňují jak vazby lignanového, tak i neolignanového typu. Tři nejběžnější fenylypropanové jednotky jsou uvedeny na Obr. 7. Každá z připojených jednotek poskytuje pak funkční místa pro další možná spojení nebo derivatizaci. Tak vzniká různě velké sesíťování, jak co do počtu vázaných jednotek, tak i co do počtu (hustoty) vazeb³². Takto vzniklé makromolekuly pak tvoří ligniny. Některé volné funkční skupiny těchto sítí mohou být glykosylovány nebo vázány na celulosu za vzniku lignocelulosových komplexů. Ty jsou pak základním stavebním prvkem dřevitých rostlin a umožňují stromům jejich mohutný vzrůst, pevnost, tvar a jiné charakteristické vlastnosti. Lignocelulosový komplex je základní surovinou pro celulosopapírenský

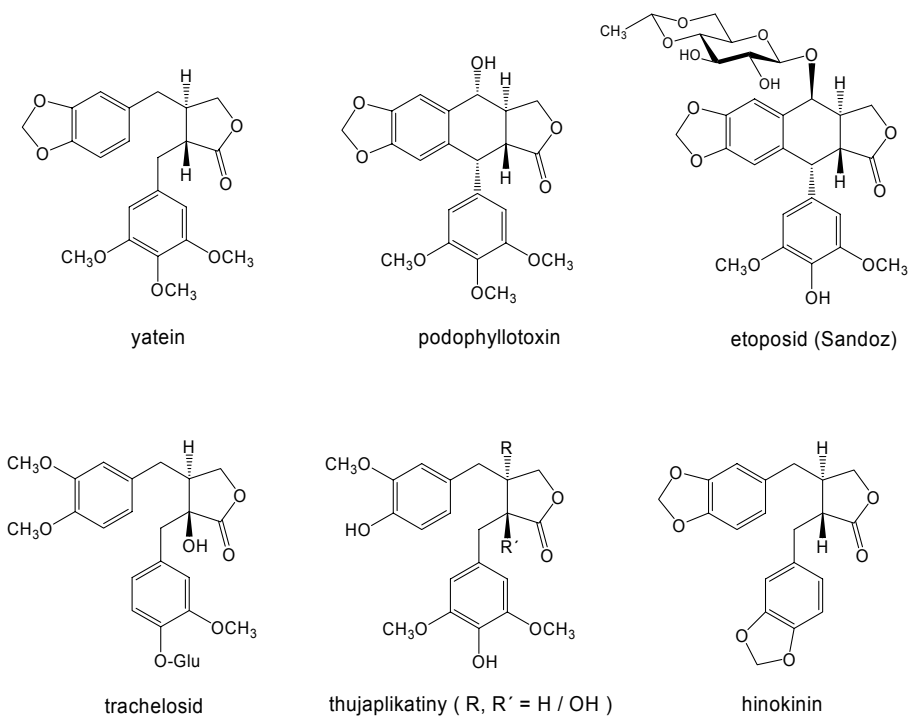
průmysl, který byl dlouhodobě výzkumnou základnou a hnací silou při studiu nejenom technologického, ale i chemického, biochemického a biologického výzkumu ligninu, lignanů a fenylypropanoidů všeho druhu.

3.1. Známé biologicky aktivní a klinicky využívané lignany

Lignany přitahovaly pozornost badatelů již odedávna. Jednak proto, že jsou hodně rozšířené v rostlinné říši, a také proto, že se vyznačují širokou škálou biologických účinků³³. Zde nelze celou tu šíři zachytit, pouze ilustrovat určitým výběrem.

Obecně, biologická funkce lignanů zatím ještě nebyla plně identifikována. Existují ovšem důkazy, že lignany hrají nezanedbatelnou roli v chemických interakcích mezi rostlinami a houbami, rostlinami navzájem a rostlinami a hmyzem¹⁸, a to buď přímo nebo zprostředkovaně, formou synergismu s jinými účinnými rostlinnými látkami³⁴. To znamená, že mají svůj význam v obranném systému hostitelských rostlin a ovlivňují tak symbiózu organismů na ekologické úrovni³⁵. Prekurzory lignanů jsou také meziprodukty nebo komponenty tvorby ligninu, tudíž mohou hrát určitou roli i v regulaci růstu rostlin.

Lignany ovšem vykazují velmi rozmanité spektrum účinků i na vyšší organismy, včetně člověka^{16,28,36,37}. Šíře jejich biologických vlastností předpokládá také šíři mechanismů účinků³⁸. Tato šíře podněcovala již odedávna jejich výzkum, v současnosti se soustřeďuje především k prozkoumání strukturně aktivních vztahů, o zmapování mís-



Obr. 8. Známé biologicky aktivní lignany

ta jejich působení, no a v konečném důsledku i o vývoj nových farmakologických preparátů. Příkladem mohou být lignany yatein a podophyllotoxin³⁹ a jeho cíleně modifikované deriváty etoposid a teniposid¹⁶ (Obr. 8), které dospěly až k aplikaci v klinické medicíně. Tato léčiva působí v širokém spektru chemoterapie rakoviny¹⁶.

Podophyllotoxin (Obr. 8) byl identifikován jako biologicky účinná, ovšem gastrointestinálně toxická obsahová látka dávno známé léčivé rostliny *Podophyllum peltatum*⁴⁰ (tzv. americké mandragory), kterou využívali už kolonisté amerického západu proti horečkám a různým parazitárním infekcím. Dobrá pověst této rostliny přetrvala až do současné doby. Její hlavní účinné složky (lignany) byly spolu s dalšími strukturními analogy z jiných rostlinných zdrojů (např. yatein z tropické dřeviny *Libocedrus yateensis*^{20,21} nebo jeho analogy z rostlin rodu *Piper*⁴¹, čeledi pepřovitých, *Piperaceae*) testovány v různých modelech vyhledávacích testů. Mnohé pak postoupily i do vyšších specializovaných předklinických a klinických testů. Některé byly po vhodně provedených chemických modifikacích (jako etoposid a teniposid), s vyšší účinností, nižší toxicitou a hlavně patentovatelnou přípravou, registrovány firmou Sandoz jako léčiva¹⁶.

Dalším příkladem biologické účinnosti lignanů je jejich antivirová aktivita⁴². Např. lignanový glukosid trachelosid (Obr. 8), původně izolovaný z rostlin rodu *Trachelospermum*⁴³, byl spolu s dalšími analogy syntetizován a testován. V testech byla prokázána účinnost série těchto látek proti HIV-1 viru (cit.⁴⁴). Trachelosid a jeho další blízké analogy (trachelogenin, carthamosid a carthamogenin) byly získány také ze známé léčivé rostliny sibiřského původu, pěstované a analyzované i u nás z parchy saflorové, *Leuzea carthamoides*^{18,34}. Tato rostlina je zdrojem i dalších cenných a biologicky účinných látek terpenického, flavonoidního, serotonin-fenylpropanoidního⁴⁵ a steroidního (především ekdysteroidního⁴⁶) typu, poskytujících regenerační, tonizující a anabolické účinky⁴⁷.

Zajímavým příkladem biologicky účinných lignanů jsou thujaplikatiny (Obr. 8) a jejich deriváty⁴⁸ z dekorativní a stavbařsky významné dřeviny *Thuja plicata* (zerav řasnatý – western red cedar). Stavby z trámů této velmi trvanlivé dřeviny jsou díky lignanům, ale také příbuzným troponům⁴⁸, biochemicky nápadně odolné vůči dřevokazným houbám^{2,48}. Třísky, hobliny či piliny této dřeviny se ve venkovských hospodářských staveních používaly v minulosti jako přírodní insekticidy³⁴. Bohužel, jejich vedlejším účinkem (vinou přítomné kyseliny plikátové⁴⁸ – strukturně příbuzné podophyllotoxinu) byly pak astmatické alergie lidí, vystavených dlouhodobému vlivu těchto prostředků⁴⁹. Podobné látky byly identifikovány i v příbuzné dřevině východního původu *Cryptomeria japonica* (japonský cedr – Sugi) a *Chamaecyparis obtusa* (japonský cypris – Hinoki)⁴⁸. Stovky let staré chrámy postavené z těchto dřevin stále odolávají houbám i termitům. Extrakty z hinoki slouží také jako surovina pro mnohé japonské medicínské, kosmetické a voňavkářské preparáty. Majoritní lignany těchto rostlin, především však hinokinin (Obr. 8) a jeho deriváty, vykazují nadprůměrnou hmy-

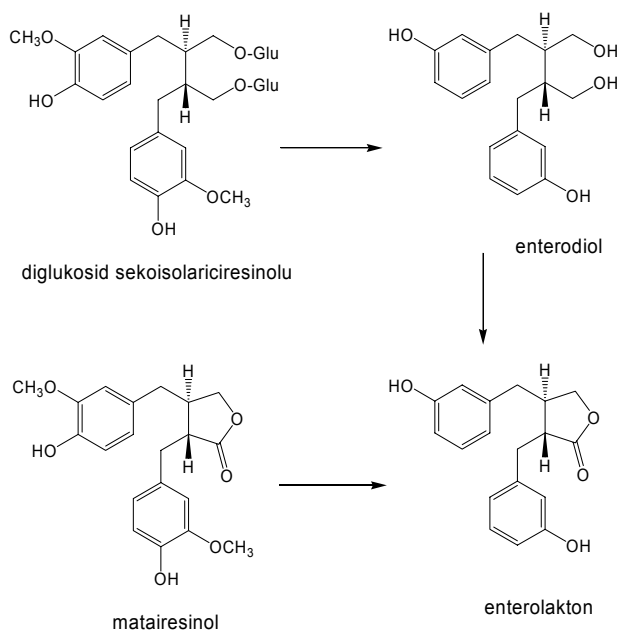
zí potravně regulační aktivitu^{18,34} a významné imunomodulační účinky⁵⁰, které jsou předmětem zájmu farmakologů i v současnosti.

Mimo thujaplikatiny (Obr. 8) a jim příbuzné lignany byly ve výše jmenovaných dřevinách identifikovány i lignanové deriváty s nižším počtem uhlíků (norlignany, Obr. 6), navíc mnohdy obsahující i konjugované dvojné vazby. Proto se některé z nich vyznačují nestálostí, vyplývající z možné oxidace na chinony, chinonmethidy a radikály, schopné tvorby následných produktů, mnohdy pestře barevných (od žluté přes oranžovou až k červené). Tyto látky dávají svým dřevinám patřícím do řádu *Coniferales* (odsud byl odvozen také jejich původní a chemotaxonomicky zdůvodnitelný název conioidy²⁰) jejich neobvyklou barvu a odolnost⁵¹. Biogenetická souvislost norlignanů s thujaplikatiny je nápadně patrná a lze ji tudíž předpokládat, ba i mechanisticky vysvětlit spolupůsobením dekarboxylací a přesmyků na průběh dimerizace fenylpropanových prekurzorů²⁰.

3.2. Fytoestrogeny lignanového typu a enterolignany rostlinného původu

Fenolická složka struktury je charakteristickým znakem estrogenních hormonů a jejich bioanalogů, počínaje tím nejúčinnějším estradiolem, jehož původně steroidní skelet je transformován v kruhu A na fenol. Mnohé další rostlinné polyfenoly mají také slabou estrogenní nebo antiestrogenní účinnost svědčící o jisté interakci s estrogenními receptory⁵². Tyto látky jsou si příbuzné nejen z hlediska své funkce, ale do značné míry i z hlediska své struktury. K nejznámějším patří látky odvozené od isoflavonoidů (genistein), kumarinů (kumestrol) a stilbenoidů (resveratrol)⁵³. Látek s účinky agonistů či antagonistů estrogenu na zmíněném receptoru je však mnohem víc⁵². Patří mezi ně i lignany dibenzylbutanového typu (Obr. 1, typ A, především ve formách II a V). Vše začalo podivným nálezem lignanu enterolaktonu v tělních tekutinách těhotných žen⁵⁴ a pokračovalo identifikací jeho analogů enterolignanů⁵⁵, objasněním jejich funkce, biogeneze i metabolismu^{52,56}. Biologické účinky a původ těchto látek jsou dosud předmětem zájmu, především z hlediska potravinářského⁵², farmakologického^{57,58}, či analytického^{55,59}.

Lignany s fytoestrogenními účinky jsou bohatě zastoupeny v běžné rostlinné potravě: sóji, rýži, obilninách, vlákninách, oříchách, ovoci³⁸, v menší míře ovšem také v nápojích, nutričně a gastronomicky tak významných, jakým je bílé a červené víno⁶⁰. Lidstvo využívá tyto zdroje v celé své historii, ovšem s různou intenzitou. Některé zdroje jsou nepostradatelné a tudíž trvalé, některé se ve vlnách vytrácejí a vracejí, ovlivňované buď ekonomickou nutností nebo mediální/reklamní popularizací. Příkladem může být sekoisolariciresinol diglukosid ze lněných semen (s obsahem 0,9–3 %, podle kultivaru)⁶¹. Tato semena, jako vedlejší produkt lnu, byla v minulosti běžnou potravou a krmivem, stejně jako lněný olej, který byl ovšem průmyslovou revolucí degradován jen na výrobu fermeží,



Obr. 9. Enterolignany a jejich prekursorzy, fytoestrogeny lignanového původu

linolea a margarínů. Přestože světová produkce lněných semen je stále asi 2,5 milionů tun ročně (čtvrtina z toho v Kanadě), nutriční využití lněných produktů vážlo. Až nyní se tyto produkty vracejí do povědomí lidí, hodně popularizované jako téměř všeléčící nutraceutika, aniž by byly jejich deklarované farmakologické a medicínální účinky uspokojivě objasněny. Známe je jen to, že matairesinolu a sekoisolariciresinolu (a i některé jiné lignany stejného strukturního typu) jsou prekursorzy dvou prokázaných xeno-estrogenů: enterodiolu a enterolaktonu (Obr. 9).

Tyto dvě látky byly původně objeveny v moči, mateřském mléku i krevním séru žen (později i samic dalších primátů) v období těhotenství, laktace, nebo různých hormonálních změn či poruch⁵⁴. Jelikož lignany s hydroxyly výlučně jen v *meta*- poloze nebyly z rostlinných zdrojů známy, dlouho se předpokládalo, že jde o látky endogenní. Až později se prokázalo, že tyto látky vznikají z exogenních zdrojů, z určitých vhodných rostlinných lignanů, a to v zažívacím traktu působením střevních bakterií^{54–56}. Zjistilo se, že procházejí stejně jako žlučové kyseliny nebo steroidní hormony enterohepatálním oběhem (což je resorpce látek do portálního krevního oběhu zachycených játry a opět vyloučených na příslušných místech svého působení). Odtud je odvozen i jejich název. Jejich účinky jsou hlavně estrogenní a kancerostatické (např. u karcinomu prsu a střev)^{52,55}. Vliv jejich nadměrného dávkování ovšem nebyl ještě dostatečně prozkoumán a objasněn^{38,52}.

4. Závěr

Lignany jsou bezesporu reprezentativní a významnou skupinou biologicky účinných sekundárních metabolitů polyfenolického typu a zároveň fenylypropanového původu. Jejich bohatá strukturní variabilita a různorodá biologická účinnost již odedávna poutá nemalou pozornost fytochemiků a periodicky, v určitých etapách, také botaniků, farmakologů, chemických ekologů a nyní i odborníků pro kvalitní a bezpečnou výživu. V současnosti roste zájem o informace kolem bioaktivních polyfenolů i u veřejnosti, která hodlá poučení využívat fytofarmaka, či nutraceutika, t. j. biologicky aktivní potravní doplňky, schopné preventivně chránit zdraví před přibývajícím chronickým chorobami a zdravotními problémy z nadměrného životního a výkonnostního stresu. Současná vlna zájmů je sice orientována právě na zmíněná hlediska a na využití těchto látek pro lepší kvalitu výživy, nicméně již víc než dvě dekády také na studium a využití v oblasti chemické ekologie a ochrany rostlin vůči škodlivým organismům a nepříznivým ekologickým vlivům. Proto byl výběr informací z literatury i z vlastní experimentální práce soustředěn především na tato hlediska. Jenom z části se dotýká vln zájmů nyní méně atraktivních, i když svého času také významných, jaké iniciovala farmakognozie či chemotaxonomie rostlin. Lignany, spolu s dalšími sekundárními metabolity, posloužily totiž jako významné chemické znaky pro botanickou klasifikaci v dobách, kdy proteomika a genomika nebyly ještě dostatečně rozvinuté a dostupné pro tyto účely.

Tato práce vznikla jako součást výzkumného záměru Z40550506 a byla podkladem k přednášce v rámci postgraduálního kurzu o chemii a biochemii přírodních látek v cyklu Organická chemie na ÚOCHB AVČR.

LITERATURA

1. Pelter A.: v knize The shikimic acid pathway. (Conn E.E., ed.), str. 201. Plenum Press, New York 1986.
2. Croteau R., Kutchan T. M., Lewis N. G., v knize: Biochemistry and Molecular Biology of Plants. (Buchanan B., Gruissem W., Jones R., ed.), str. 1250. American Society of Plant Physiologists, 2000.
3. Schoonhoven L. M., Jermy T., van Loon J. J. A.: Insect-Plant Biology, Chapman Hall, London 1998.
4. Harborn J. B.: Introduction to Ecological Biochemistry, 4. vyd., Academic Press, London 1993.
5. Harmatha J., v knize: Saponins in Food, Feedstuffs and Medicinal Plants (Oleszek W., Marston A., ed.), str. 129. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht 2000.
6. Hartmann T.: Entomol. Exp. Appl. 80, 1777 (1996).
7. Harborn J. B., v knize: Herbivores. Their Interactions with Secondary Plant Metabolites Vol. I. (Rosenthal G. A., Berenbaum M. R., ed.), str. 389, 2. vyd. Acad. Press, San Diego 1991.

8. Hagerman A. E., Butler L. G., v knize: *Herbivores. Their Interactions with Secondary Plant Metabolites* Vol. I. (Rosenthal G. A., Berenbaum M. R., ed.), str. 355, 2. vyd. Acad. Press, San Diego 1991.
9. XXII International Conference on Polyphenols, ve sborníku: *Polyphenols Communications 2004* (Hoikkala A., Soidinsalo O., Wähälä K., ed.), Helsinki 2004.
10. Harborn J. B., v knize: *Natural Products. Their Chemistry and Biological Significance*. (Mann J., Davidson R. S., Hobbs J. B. a spol., ed.), str. 362. Longman, Harlow 1994.
11. Harborn J. B.: v knize: *Biochemical Aspects of Plant and Animal Coevolution*. Academic Press, London 1978.
12. Harmatha J., Žďárek J.: ve skriptech: *Chemie přírodních látek* (Bláha K., ed.) 7. sv. cyklu *Organická chemie*. ÚOCHB ČSAV, Edice Macro N-8, Praha 1982.
13. Harmatha J.: ve skriptech: *Chemie a biochemie přírodních látek* (Kohout L. a spol., ed.), 27. sv. cyklu *Organická chemie*. ÚOCHB AVČR, Praha 2002.
14. Dewick P. M.: *Natural Product Reports* 4, 173 (1994).
15. Blažej A., Šutý L.: *Rastlinné fenolové zlúčeniny*. Vydavateľstvo ALFA, Bratislava 1973.
16. Ayres D.C., Loike J.D.: *Lignans. Chemical, Biological and Clinical Properties*. Cambridge University Press 1990.
17. Umezawa T.: *Phytochemistry Rev.* 2, 371 (2003).
18. Harmatha J., Dinan L.: *Phytochemistry Rev.* 2, 321 (2003).
19. Whiting D. A.: *Nat. Prod. Rep.* 4, 499 (1987).
20. Erdtman H., Harmatha J.: *Phytochemistry* 18, 1495 (1979).
21. Harmatha J., Buděšínský M., Trka A.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 47, 644 (1982).
22. Umezawa T., Okunishi T., Shimada M.: *Wood Research (Kyoto)* 84, 62 (1997).
23. Samek Z., Harmatha J.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 43, 2779 (1978).
24. Dewick P. M., v knize: *Studies in Natural Products Chemistry*. Vol. 5. *Structure Elucidation (Part B)*, (Atta-ur-Rahman, ed.), str. 459. Elsevier Sci. Publ. B.V., Amsterdam 1989.
25. Davin L. B., Lewis N. G.: *Plant Physiol.* 123, 453 (2000).
26. Davin L. B., Lewis N. G.: *Phytochemistry Rev.* 2, 257 (2003).
27. Gottlieb O. R., v ročence: *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, (Zechmeister L., zakl.; Herz W., Grisebach H., Kirby G. W., ed.), Vol. 35, str. 1. Springer-Verlag, Wien 1978.
28. Apers S., Vlietinck A., Pieters L.: *Phytochemistry Rev.* 2, 201 (2003).
29. Suzuki S., Umezawa T., Shimada M.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* 2001, 3252.
30. Yoshida K., Hiraide M., Nishiguchi M., Hishiyama S., Kato A.: *Bulletin of FFPRI*, (Tsukuba, Japan), Vol 3, 25 (2004).
31. Chen Y., Sarkanen S.: *Phytochemistry Rev.* 2, 235 (2003).
32. Lewis N. G., Davin L. B., Sarkanen S., v knize: *Lignin and Lignan Biosynthesis* (Sarkanen S., Lewis N. G., ed.), ACS Symp. Ser. 697, str. 1–27. Amer. Chem. Soc., Washington 1998.
33. MacRae W. D., Towers G. H. N.: *Phytochemistry* 23, 1207 (1984).
34. Harmatha J., Nawrot J.: *Entomol. Exp. Appl.* 104, 51 (2002).
35. Garcia E. S., Azambuja P.: *Toxicon* 44, 431 (2004).
36. Slanina J.: *Chem. Listy* 94, 111 (2000).
37. Lee K-H., Xiao Z.: *Phytochemistry Rev.* 2, 341 (2003).
38. Westcott N. D., Muir A. D.: *Phytochemistry Rev.* 2, 401 (2003).
39. Gordaliza M., Garcia P. A., Miguel del Coral J. M., Castro M. A., Gomez-Zurita M. A.: *Toxicon* 44, 441 (2004).
40. Hartwell J. L., Schrecker A. W.: v ročence: *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, (Zechmeister L., ed.), Vol. 15, str. 83. Springer-Verlag, Wien 1958.
41. Jensen S., Hansen J., Boll P. M.: *Phytochemistry* 33, 523 (1993).
42. Charlton J. L.: *J. Nat. Prod.* 61, 1447 (1998).
43. Nishibe S., Hisada S., Inagaki I.: *Chem. Pharm. Bull.* 21, 1108 (1973).
44. Yang L-M., Lin S-J., Yang T-H., Lee K-H.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 6, 941 (1996).
45. Pavlík M., Laudová V., Grüner K., Vokáč K., Harmatha J.: *J. Chromatography, B* 770, 291 (2002).
46. Lafont R., Harmatha J., Marion-Poll F., Dinan L., Wilson I. D.: *Ecdybase – The Ecdysone Handbook*, 3. vyd., str. 1–710. Cybersales, Praha 2002. <http://ecdycbase.org>
47. Opletal L., Sovová M., Ditttrich M., Solich P., Dvořák J., Krátký F., Čechovský J., Hofbauer J.: *Čes. a Slov. Farm.* 46, 247 (1997).
48. Erdtman H., Norin T.: v ročence: *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, (Zechmeister L., ed.), Vol. 24, str. 206. Springer-Verlag, Wien 1966.
49. Cartier A., Chan H., Malo J. L., Pineau L., Chan-Yeung M.: *J. Allergy Clin. Immunol.* 77, 639 (1986).
50. Harmatha J., Kmoníčková E., Zidek Z.: ve sborníku *Polyphenols Communications 2004*, (Hoikkala A., Soidinsalo O., Wähälä K., ed.), str. 217. Gummerus Printing, Jyväskylä, Helsinki 2004.
51. Ishiguri F., Maruyama S., Takahashi K., Abe Z., Yokota S., Andoh M., Yoshizawa N.: *J. Wood Sci.* 49, 135 (2003).
52. Committee on Toxicity of Chemicals in Food: *Phytoestrogens and health, COT Report – published by the Food Standards Agency, London*. Crown copyright 2003. Internet web site. <http://www.food.gov.uk/multimedia/webpage/phytoestrogens.htm>

53. Moravcová J., Kleinová T.: Chem. Listy 96, 282 (2002).
54. Adlercreutz H.: ve sborníku Polyphenols Communications 2004, (Hoikkala A., Soidinsalo O., Wähälä K., ed.), str. 1. Gummerus Printing, Jyväskylä, Helsinki 2004.
55. Raffaelli B., Hoikkala A., Leppälä E., Wähälä K.: J. Chromatography, B 777, 29 (2002).
56. Heinonen S., Nurmi T., Liukkonen K., Poutanen K., Wähälä K., Deyama T., Nishibe S., Adlercreutz H.: J. Agric. Food Chem. 49, 3178 (2001).
57. Cornwell T., Cohick W., Raskin I.: Phytochemistry 65, 995 (2004).
58. Stárka L., Hampl R., Lapčík O., Adlercreutz H.: DMEV 2/1, (1999) Tigris web. <http://www.tigris.cz/dmev/dmev199/Obsah.htm>
59. Slanina J., Glatz Z.: J. Chromatography, B 812, 215 (2004).
60. Nurmi T., Heinonen S., Mazur W., Deyama T., Nishibe S., Adlercreutz H.: Food Chem. 83, 303 (2003).
61. Muir A. D., Westcott N. D.: J. Agric. Food Chem. 48, 4048 (2000).

J. Harmatha (*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*): **Structural Abundance and Biological Significance of Lignans and Related Plant Phenylpropanoids**

The article reviews chemical and biological properties of lignans and related phenylpropanoids. Their rich structural variability results from their biogenesis and the dominant position among secondary plant metabolites. The information on lignans is based on relevant literature and own experimental results. The chemo-ecological role of lignans in plants as well as various pharmacological effects and utilisation of phenylpropanoids as functional nutrient additives or as established pharmaceuticals are emphasized.

Polysacharidy, jejich význam a uplatnění

V přírodě je každým rokem syntetizováno $4 \cdot 10^{11}$ tun sacharidů převážně ve formě polysacharidů. Polysacharidy patří mezi biologické polymery, které mají důležitou úlohu při stavbě rostlin, živočichů, hub a mikroorganismů (celulosa, chitin, pektin, hemicelulosa) a jsou zdrojem energie pro různé biochemické reakce (škrob, fruktany). Mohou se také zúčastňovat dalších procesů, např. ovlivňují srážlivost krve (heparin) nebo hospodaření s vodou (rostlinné gumy a slizy). Kromě polysacharidů se v přírodě vyskytují proteoglykany, což jsou makromolekuly vyskytující se živočišných organismech. Jsou tvořeny glykosaminoglykany kovalentně vázané na protein. Nacházejí se uvnitř buňky, jsou součástí buněčné stěny a mimobuněčné matrice. Na základě velké rozmanitosti proteoglykanů se usuzuje na řadu jejich biologických funkcí, ale pouze část těchto funkcí byla doposud vysvětlena. Zřejmě nejdále postoupil výzkum funkce proteoglykanů nervových tkání.

Z krátkého přehledu vyplývá, jakými odlišnými vlastnostmi se polysacharidy vyznačují, přičemž na jejich tvorbě se podílí pouze několik monosacharidů a jejich derivátů, převážně D-glukosa, D-galaktosa, D-mannosa, 2-amino-2,6 deoxyglukosa, L-arabinsa, D-xylosa a D-galakturonová kyselina. Tyto monosacharidy se vyskytují jako α nebo β anomery a jsou nejčastěji vázány ($1 \leftrightarrow 4$) glykosidovými vazbami. Zejména stavební polysacharidy jsou lineární, avšak obecně mohou být polysacharidy více či méně větveny.

Polysacharidy mají nejen nepostradatelný význam v přírodě, ale také mají široké využití v potravinářství, farmacii a v dalších průmyslových odvětvích. Např. celulosa, nejrozšířenější stavební polysacharid rostlin, je základem papíru, textilních tkanin, stavebních hmot, její deriváty se používají jako zahušťovací prostředky do potravin a jsou důležitou součástí různých forem léků. Škrob, který je nejrozšířenější zásobní polysacharid rostlin, má často podobné použití jak v nativní formě, tak ve formě derivátů, jako celulosa. Deriváty škrobu, tzv. hydrokoloidy na míru, se používají do desertů, zmrzlin, cukrovinek, zahušťují omáčky, různé dresinky a kečupy, a mimo jiné jsou součástí uzenin a masných výrobků.

Pektin je v přírodě součástí buněčné stěny rostlin a patří nejen k nejrozšířenějším polysacharidům v přírodě, ale podobně jako škrob nebo deriváty celulosy, se široce používá v potravinářském průmyslu, např. jako výborná želirující látka. Pektin snižuje obsah cholesterolu v krvi a má také schopnost vázat ionty těžkých kovů. Chemické modifikace molekuly mohou výrazně měnit jeho vlastnosti a umožnit nová použití, dosud však toho, na rozdíl od škrobu, nebylo náležitě využíváno. Pektin má některé výhody proti škrobu vyplývající z přítomnosti částečně esterifikovaných karboxylů v jeho molekule. Tyto skupiny jsou vhodné pro snadné chemické modifikace (transesterifikace, amidace), které mohou vést k výrazným změnám fyzikálně-chemických a biologických vlastností vzniklých derivátů. Hydrofobně upravené deriváty pektinů vznikají vazbou nepolárních skupin na pektinové makromolekuly pomocí alkylace, acylace, esterifikace nebo amidace. Tyto deriváty nacházejí uplatnění při stabilizaci emulzí nebo pro zachycování a odstraňování nepolárních molekul, např. uhlovodíků, tuků, cholesterolu a žlučových kyselin. Pektin je v lidském těle dobře fermentovatelný sub-

strát, proto je rozštěpen již v přední části tlustého střeva. Nádory a záněty však vznikají v dolní části tlustého střeva. Chemická derivatizace pektinu může snížit jeho dostupnost pro mikroorganismy a modifikovaný pektin by mohl být fermentován podél celého tlustého střeva a tím ho chránit. Amidace pektinu navíc zvýší jeho afinitu k žlučovým kyselinám a tukům. Dalším příkladem využití modifikovaného citrusového pektinu spočívá v tom, že blokuje galektin-závislou adhezi nádorových buněk na povrchu zdravé tkáně, a tím zabraňuje metastázi.

Důležitým příkladem polysacharidu s širokým spektrem využití v průmyslu a medicíně je chitin a chitosan. Chitin je po celulóse druhým nejvíce se vyskytujícím přírodním biopolymérem. Na rozdíl od celulosy však neobsahuje glukosu, ale její derivát N-acetylglukosamin. Je hlavní složkou exoskeletu bezobratlých živočichů (krabů, koryšů, měkkýšů, chobotnic), buněčných stěn hub (plísni, kvasinek, vyšších hub) a vyskytuje se i v krovkách hmyzu. Komerční chitin se získává především z odpadních produktů vzniklých při zpracování mořských živočichů. Chitosan, deacetylovaná forma chitinu, se pro své význačné vlastnosti používá v mnoha průmyslových oborech, zejména v potravinářství jako součást potravinových doplňků a přípravků na snížení hmotnosti.

Skupina polysacharidů, která je v současné době hojně studována, jsou β -glukany¹. Tyto polysacharidy mají hlavní řetězec tvořený glukosou vázanou β glykosidovou ($1 \leftrightarrow 3$) vazbou a jsou podle původu více či méně větveny vazbou ($1 \leftrightarrow 6$). β -Glukany jsou součástí buněčných stěn rostlin, mikroorganismů a vyšších hub. Poměrně vyšší obsah těchto polysacharidů mají nesladovnické ječmeny. Předmětem zkoumání je schopnost β -glukanů příznivě ovlivňovat imunitní systém člověka a snižovat hladinu cholesterolu v krvi, takže tyto polysacharidy mají v současné době uplatnění v potravinářských doplncích, avšak intenzivně se ověřuje jejich využití v farmacii. β -Glukany jsou také součástí kosmetických krémů, kde mají za úkol vázat vodu, působí jako antioxidanty a uklidňují podrážděnou pleť.

Studium polysacharidů je z mnoha hledisek zajímavá oblast chemie. Příroda je nevyčerpatelným zdrojem těchto látek, které nacházejí buď přímo nebo po chemické nebo enzymové úpravě celou řadu nových uplatnění, občas diskutabilních, příkladem mohou být náhrady tuků (fat mimetics) v potravinách. Zřejmě nejvíce komplikované, ale zároveň nejvíce vzrušující, je objasnění úlohy a významu proteoglykanů či glykoproteinů.

Ústav chemie a technologie sacharidů na Vysoké škole chemicko-technologické (VŠCHT) se již řadu let zabývá studiem struktury a modifikace polysacharidů. Pozornost je zejména soustředěna na pektin, chitin a β -glukany vyšších hub. Tento výzkum probíhá ve spolupráci s řadou pracovišť VŠCHT, Ústavem živočišné genetiky a fyziologie AV, Ústavem makromolekulární chemie AV a Výzkumným ústavem potravinářského průmyslu. Výzkum je podporován projekty Grantové agentury ČR, Fondem rozvoje vysokých škol a výzkumnými záměry VŠCHT.

Jana Čopíková, Andryi Synytsya

1. Větvicka V.: Chem. Listy 98, 963 (2004).

STRUKTURA A VLASTNOSTI PŘÍRODNÍCH HUMINOVÝCH LÁTEK TYPU OXIHUMOLITU

LENKA VESELÁ^a, MARTIN KUBAL^b,
JOSEF KOZLER^c a PETRA INNEMANOVÁ^a

^aDivize sanačních a ekologických projektů, Středisko Praha, DEKONTA, a.s., Volutová 2523, 158 00 Praha 5,

^bÚstav chemie ochrany prostředí, Fakulta technologie ochrany prostředí, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^cVýzkumný ústav anorganické chemie, Revoluční 84, 400 01 Ústí nad Labem
vesela@dekonta.cz, innemanova@dekonta.cz,
martin.kubal@vscht.cz, josef.kozler@vuanch.cz

Došlo 2.7.04, přepracováno 13.1.05, přijato 2.3.05.

Klíčová slova: huminové látky, huminové kyseliny, oxihumolit, interakce, kontaminant

Obsah

1. Úvod
2. Struktura a vlastnosti huminových látek
3. Charakteristika oxihumolitů a jejich ložiska v České republice
4. Předpokládané interakce huminových látek s kontaminanty přítomnými v životním prostředí
5. Závěr

1. Úvod

Huminové látky jsou přírodní organické sloučeniny vzniklé chemickým a biologickým rozkladem organické hmoty (zbytků rostlin, živočichů apod.) a syntetickou činností mikroorganismů. Přirozeně se vyskytují zejména v sedimentech, zeminách, rašelině, hnědém uhlí, lignitu a některých dalších materiálech^{1–7}. Obsah huminových látek v přírodních matricích kolísá od stopových množství (písky, jíly), přes jednotky procent (běžné zeminy) až k desítkám procent (hnědé uhlí, lignit). Mimořádně vysoký obsah – 80 % a více – potom vykazuje např. rašelina. Uvádí se, že ve svrchní vrstvě souše (asi 1,23.10¹² m²) je celkově obsaženo 1,143–1,314 Tt uhlíku ve formě huminových látek⁸. Pod jedním čtverečním metrem souše lze tedy v průměru nalézt 9,29–10,69 kg této formy uhlíku. Toto množství je nesporně značné nejenom např. pro zemědělské využití, ale nabízí také značný potenciál z hlediska uskutečnění přirozených dekontaminačních procesů⁸.

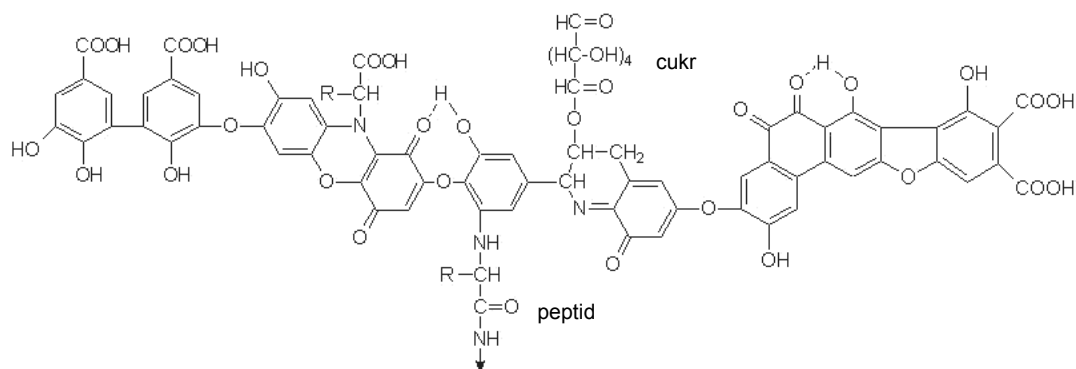
Huminové látky jsou již po řadu desetiletí předmětem

intenzivního vědeckého zájmu, který vychází zejména z jejich výhodně využitelných chemických a fyzikálních vlastností^{1–7,9–15}. V současnosti mají huminové látky poměrně rozsáhlé využití, které je možné rozdělit na následující oblasti: aplikace v zemědělství, průmyslové použití, využití v oblasti ochrany životního prostředí, farmakologické použití a využití jako palivo¹⁶. V zemědělství jsou tyto látky využívány zejména jako hnojivo v podobě humátů, příkladem průmyslového a farmakologického použití materiálů s obsahem huminových látek může být izolace huminových kyselin z hnědého uhlí, lignitu nebo rašeliny. Do současnosti byla napsána celá řada postupů použitelných pro izolaci huminových kyselin a jejich oddělení od fulvokyselin (včetně patentování specifických metodik izolace)^{17–27}. Využití huminových látek v oblasti ochrany životního prostředí je rovněž cílem poměrně intenzivního vědeckého výzkumu, zejména potom v posledních dvou desetiletích^{28–34}. Atraktivita huminových látek v této oblasti použití je zejména dána skutečností, že se jedná o látky přirozeného původu s dostatečnými zásobami v přírodních matricích^{1–8} a s potenciálně vhodnými vlastnostmi^{1,10–13,35,36}.

2. Struktura a vlastnosti huminových látek

Molekulová hmotnost huminových látek se pohybuje přibližně v rozmezí od 2000 do 200 000. Huminové látky jsou strukturně velmi složité a doposud ne zcela přesně popsány, přestože jsou předmětem studia více než 100 let^{6,7,9}. Znalost strukturního složení huminových látek je však nezbytná pro pochopení jejich možných fyzikálně-chemických interakcí s látkami přítomnými v životním prostředí^{28–35,38–46}. Za hlavní složky huminových látek jsou obvykle považovány huminové kyseliny, fulvokyseliny a humin.

Huminové kyseliny představují takovou frakci huminových látek, která není rozpustná v kyselých a neutrálních vodných roztocích, ale je v těchto roztocích rozpustná při vyšších hodnotách pH. Huminové kyseliny tedy mohou být získány alkalickým loužením vhodné matrice a následným okyselením výluhu. Pravděpodobně první návrhy struktury huminových kyselin byly předloženy téměř současně Stevensonem¹⁰ v roce 1972 a Harworthem¹¹ v roce 1973. V analogii s tehdy vznikající hypotetickou strukturní formulí hnědého uhlí se předpokládalo, že huminové látky obsahují primárně v základní strukturní síti zabudované polyaromatické uhlovodíky. Tato strukturní představa je dnes však už v zásadě opuštěná. V následujících dvaceti letech došlo pak k řadě zásadních objevů ve struktuře huminových kyselin, a to zejména díky pokrokům dosaženým v oblasti instrumentální analýzy. Tyto objevy postupně objasnily, že ve struktuře huminových kyselin jsou

Obr. 1. Hypotetický strukturní vzorec huminové kyseliny¹

zabudovány aromatické a hydroaromatické di-, tri- a tetra-kyseliny^{1,12,13,35,36}.

Příklad možné struktury huminových kyselin je uveden na Obr. 1.

Huminové kyseliny jsou obecně považovány za komplexní aromatické makromolekuly, kde spojení mezi aromatickými skupinami zajišťují aminokyseliny, aminocukry, peptidy a alifatické sloučeniny. Hypotetická struktura huminové kyseliny uvedená na Obr. 1 obsahuje volné a vázané fenolické skupiny -OH, chinonové struktury, dusíkové a kyslíkové atomy ve funkci můstků a karboxylové skupiny umístěné na aromatických kruzích. Obsah hydroxylových skupin v karboxylových a fenolických jednotkách se pohybuje v rozmezí od 3 až do 10 meq g⁻¹ a je závislý na původu suroviny a použitém způsobu zpracování huminových látek²⁶. Huminové kyseliny tedy vykazují polyaniontový charakter a mohou vázat ionty různými mechanismy (jak chemickými, tak fyzikálními)^{13,30,35,36,47,48}. Uvedení strukturních vzorců huminových kyselin provázela řada výhrad, což ovšem při složitosti těchto látek bylo v zásadě očekávatelné^{15,49}.

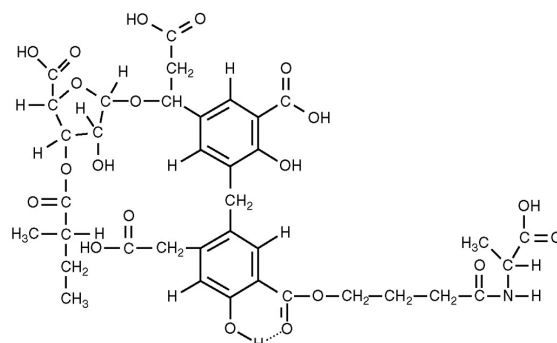
V publikovaných strukturních vzorcích huminových kyselin (kde strukturu na Obr. 1 lze chápat jako jednu z možných variant) často nebývají uváděny některé další, pro chemickou reaktivitu huminových kyselin velmi důležité strukturní formace. Jsou to např. chinoidní oxidačně-redukční struktury vykazující schopnost tvorby semichinoidních seskupení. Oxidačně-redukční aktivita huminových kyselin je známa téměř čtyři desetiletí⁵⁰, kde např. huminové kyseliny připravené z rašeliny byly hydrogenovány a pak titrovány ke stanovení oxidačně-redukčního potenciálu⁵¹, který byl nalezen mezi 0,32 a 0,36 V. Pro huminové kyseliny byl také opakovaně zjištěn pozitivní EPR signál svědčící o existenci nepárového elektronu odpovídajícího zřejmě semichinoidnímu uhlíkatému radikálu^{25,52}. Zajímavé je v této souvislosti např. pozorování přímé redukční schopnosti huminových kyselin⁵³ při redukci rtuťnatých iontů na kovovou rtuť. Podobná redukční aktivita humi-

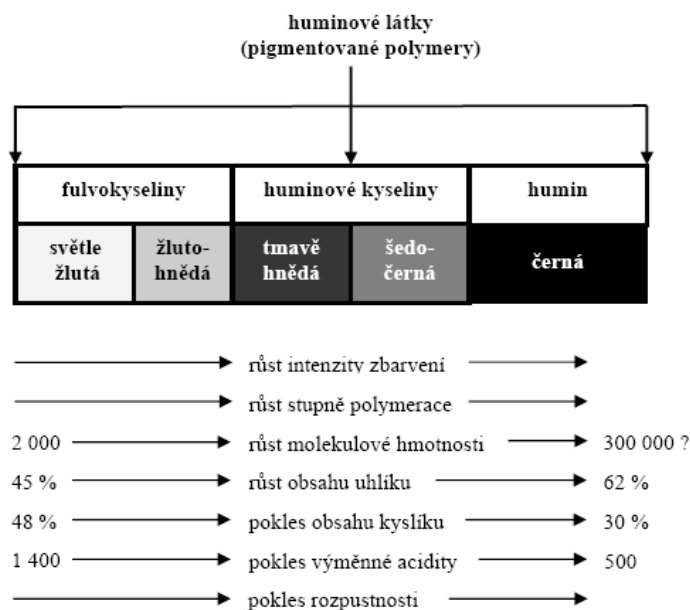
vých kyselin byla pozorována při redukci Cr⁶⁺ a Au³⁺ a některých organických barviv.

Přítomnost chinoidních struktur, přesněji řečeno přímo 2-methylnaftochinonu, byla prokázána již téměř před třemi desetiletími⁵⁴. Koncentrace chinonů v regenerované huminové kyselině získané vysokotepepnou a vysokotlakou oxidací bituminosního uhlí může být až o dva řády vyšší¹⁹. Tato konstatování jsou velmi významná, protože právě chinoidní struktury jsou dosti důležité při přímém chemickém vytváření kovalentních vazeb humusu s cizorodými látkami bez asistence enzymatické katalýzy.

Fulvokyseliny představují takovou frakci huminových látek, která je rozpustná ve vodě v zásadě v celém rozmezí pH a která zůstává v roztoku po odstranění huminových kyselin okyselením (obr. 2). Zabarvení fulvokyselin se pohybuje v rozmezí od světle žlutého do žlutohnědého. Humin představuje takovou frakci huminových látek, která se ve vodě nerozpouští ani při kyselé ani při alkalické hodnotě pH. Humin potom vykazuje černou barvu¹.

Existuje teorie, že tmavé zbarvení huminových látek je vázáno na přítomnost složek s vysokou molekulovou hmotností. Podle této teorie mohou být rozdíly mezi humi-

Obr. 2. Hypotetický strukturní vzorec fulvokyseliny⁵⁵

Obr. 3. Vlastnosti humínových látek¹

novými kyselinami a fulvokyselinami vysvětleny rozdílem v molekulové hmotnosti, počtu funkčních skupin (karboxylových, fenolických) a míře polymerace. S nárůstem molekulové hmotnosti tedy dochází ke změně obsahu uhlíku a kyslíku, kyselosti a míře polymerace, jak je ukázáno na Obr. 3. Nízkomolekulární fulvokyseliny vykazují vyšší obsah kyslíku, ale nižší obsah uhlíku nežli vysokomolekulární humínové kyseliny. Fulvokyseliny obsahují větší počet funkčních skupin kyselého charakteru, zvláště skupin -COOH . Celková kyselost fulvokyselin ($900\text{--}1\,400\text{ meq.}100\text{ g}^{-1}$) je podstatně vyšší nežli kyselost humínových kyselin¹ (Obr. 3).

3. Charakteristika oxihumolitů z ložisek v České republice

Oxidovaná mladá hnědá uhlí tzv. oxihumolity mohou obsahovat až 90 hm. % biochemicky vysoce aktivních humínových látek. V České republice jsou jedny z nejkvalitnějších oxihumolitů na světě³⁴, např. oxihumolity z některých lokalit v severních Čechách obsahují více než 80 % humínových kyselin a zároveň mají malý obsah bitumenu ($< 0,1\%$) a anorganických sloučenin²⁶.

Systematické mapování dostupných ložisek oxihumolitů v ČR provádí VÚAnCh Ústí nad Labem. Např. v letech 2000 až 2001 provedl porovnání vlastností oxihumolitů z ložisek na Teplicku (důl Václav u Duchova), na Mostecku (lom Vršany) a na Sokolovsku (lomy Družba, Marie, Jiří a Silvestr). Za nejkvalitnější oxihumolity z výše uvedených lokalit jsou považovány produkty z Duchova, tzv.

Bílinské oxihumolity^{26,56–59}. Tyto oxihumolity mají nízký obsah popela ($4,2\text{--}17\%$ v sušině), vysoký obsah humínových látek ($85\text{--}95\%$) a rovněž poměrně vysoký obsah funkčních skupin. Pro srovnání lze uvést, že oxihumolity z oblasti Mostecká obsahují $50\text{--}60\%$ popela v sušině a $30\text{--}40\%$ loužitelných humínových látek HS_L (cit.²⁶), zatímco obsah funkčních skupin se pohybuje na úrovni bílinských oxihumolitů. Složení oxihumolitů ze Sokolova není jednotné a závisí na těžené lokalitě; nejkvalitnější je oxihumolit z bývalého lomu Silvestr. Toto ložisko však již bylo uzavřeno. Z hlediska obsahu humínových látek jsou poměrně stabilní i oxihumolity z lomů Jiří a Marie. Oxihumolity z lomu Marie mají vysoký obsah popela ($51,8\%$ v sušině), kterému odpovídá i vyšší obsah Al a Si, obsah funkčních skupin není příliš vysoký. Oxihumolit z lomu Jiří má poměrně vysoký obsah humínových látek ($47,6\%$ v sušině) i celkových funkčních skupin. Naopak oxihumolity z lomu Družba se vyznačují poměrně nízkým obsahem popela, ale také velmi nízkým obsahem loužitelných humínových látek a i jejich ostatní vlastnosti je zařazují spíše k uhlí⁶⁰.

Oxihumolity ze Sokolova a Mostu mají v porovnání s bílinskými menší podíl aromatických složek a více složek alifatických, čemuž odpovídá i větší obsah vodíku. Elementární analýza ukázala, že vzorky oxihumolitů ze Sokolova a Mostu se také od bílinských liší nižším obsahem uhlíku a vyšším obsahem kyslíku⁶⁰. Obsah volných radikálů, který má podle poznatků z literatury vztah k biologické aktivitě, je nejvyšší (v řádu 10^{18} na 1 g HS) u vzorků, které jsou svými vlastnostmi blízké uhlí (sokolovské oxihumolity z lomu Družba), v ostatních

Tabulka I
Základní vlastnosti huminových kyselin²⁶

Vzorek	H ₂ O [%]	Popel ^a [%]	FA ^b [%]	Funkční skupiny ^b [meq g ⁻¹]		<i>M_w</i>	<i>M_n</i>	E4/E6
				celková kyselost	–COOH			
HA I	5,99	4,13	2,03	8,42	3,64	19 300	10 200	7,28
HA II	7,50	18,93	5,13	9,18	3,59	19 900	12 700	7,74
HA III	4,36	4,46	13,69	7,46	2,87	33 700	16 600	5,87
HA IVa	4,26	78,14	9,96	13,76	4,54	22 600	6 200	3,31
HA IVb	6,39	29,94	5,09	11,07	5,26	16 400	7 000	3,96
HA Va	9,67	9,12	2,80	8,73	3,40	18 500	10 000	6,43
HA Vb	9,60	0,73	3,99	9,61	4,99	14 100	9 200	13,30
HA Vc	6,45	6,07	27,61	6,07	3,71	14 000	10 100	14,10
HA Vd	11,06	11,45	1,84	7,40	3,25	18 700	7 800	5,71
Fluka	5,63	18,07	5,84	7,46	1,01	20 000	9 800	5,72

^a Bez vody, ^b bez vody a popela, FA – fulvokyseliny, HA – huminové kyseliny, HA I – lokalita důl Václav u Bíliny, HA II – lokalita Vršany, HA III – lokalita Hora Sv. Šebestiána, HA IV – lokalita Chotěšov (a,b – vzorky připraveny různým postupem), HA V – lokalita důl Václav u Bíliny (a,b,c,d – vzorky připraveny různým postupem), Fluka – komerčně dostupné huminové kyseliny od fy Fluka, *M_w* – hmotnostně střední molekulová hmotnost, *M_n* – číselně střední molekulová hmotnost, E4/E6 – poměr optických absorbancí při 465 a 665 nm

vzorcích se počet radikálů v 1 g organické hmoty pohybuje v řádu 10¹⁶ až 10¹⁷ (cit.⁶⁰).

V současné době jsou oxihumolity zpracovány především na humát sodný a humát draselný; v omezené míře pak i např. na huminové kyseliny a humáty dalších kovů. Díky nízké ceně oxihumolitů (vznikají jako odpad při těžbě uhlí) a jejich iontové výměnných vlastnostech je uvažováno o jejich dalším možném použití, zejména v úloze sorbentů při čištění odpadních vod, odstraňování těžkých kovů apod.^{26,33,34}. Pro toto uplatnění hovoří zejména fakt, že huminové kyseliny extrahované z oxihumolitů mají podobné nebo lepší iontové výměnné vlastnosti než huminové kyseliny extrahované z rašeliny a hnědého uhlí²⁶. Detaily jsou uvedeny v tabulce I (HA I a HA II jsou vzorky huminových kyselin izolovaných z oxihumolitu).

Iontově výměnné vlastnosti oxihumolitů lze dále ještě zlepšovat např. oxidací vzdušným kyslíkem (za tepla), promytím minerálními kyselinami (při kterém dojde k odblokování funkčních skupin obsazených převážně ionty Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Al³⁺, Fe²⁺) a sulfonací (zvýšení výměnné kapacity a snížení rozsahu výměny k nižším pH)^{26,33,34,61}. Také předčištění oxihumolitu kyselinou má za následek zvýšení selektivity sorpce některých kovových iontů⁵⁷. Pro využití oxihumolitů pro detoxikaci kontaminantů hovoří také skutečnost, že tyto látky jsou schopny hydrofobních interakcí s různými hydrofobními a amfipatickými látkami, jejímž vlivem kontaminující látka ztrácí část své účinnosti^{39–43,46,62}. Tímto způsobem lze např. výrazně zlepšovat podmínky pro mikrobiální degradaci těchto látek, a tím využití iontové výměnných vlastností huminových látek v bioremediačních technologiích⁴⁸.

4. Předpokládané interakce huminových látek s kontaminanty přítomnými v životním prostředí

Z hlediska využitelnosti huminových látek, respektive oxihumolitu, v oblasti ochrany životního prostředí, např. v sanačních technologiích, je důležitá znalost možných vazebných interakcí těchto látek s kontaminujícími látkami přítomnými v prostředí. Přibližnou představu o možných vazebných interakcích lze odvodit především z doposud známých informací o struktuře a některých dalších vlastnostech huminových látek^{1,12,13,35–41}.

Na základě dostupných informací tedy můžeme předpokládat několik typů vazebných interakcí mezi huminovými látkami a cizorodými látkami přítomnými v zemině³¹.

Iontová vazba. Tento typ vazby vychází z působení elektrostatických sil mezi fixními náboji přítomných funkčních skupin a ionty vyskytujícími se v roztoku. Uvažujeme-li iontovou vazbu, potom lze ve zjednodušeném pohledu na huminové látky pohlížet jako na ionexy, kterým lze v některých případech přisuzovat vlastnosti srovnatelné se syntetickými ionexy³². Vznik elektrostatické vazby lze u huminových látek předpokládat např. v případě alkalických kovů a amoniaku.

Koordinační vazba. Z hlediska imobilizace toxických kovů představuje nejdůležitější typ vazebné interakce koordinační vazba mezi makromolekulární maticí huminových látek a ionty kovů schopných tento typ vazby vytvářet. Potenciál ke vzniku koordinačních vazeb je zde dán zejména značným zastoupením karboxylových, fenolic-

kých a dalších funkčních skupin ve struktuře huminových látek. Předpověď průběhu komplexotvorných reakcí pro konkrétní typ huminových látek, resp. oxihumolitu, bude ovšem s ohledem na složitost makromolekulární struktury velmi obtížné. Vytváření koordinačních vazeb je tedy zejména důležité při odstraňování toxických kovů nacházejících se např. v podzemních nebo odpadních vodách. Na vzniku koordinačních vazeb se v huminových látkách nejvíce podílejí karboxylové a fenolické funkční skupiny, kde zastoupení těchto dvou funkčních skupin je kromě jiného ovlivněno hodnotou pH a tím i mírou disociace těchto funkčních skupin^{44,45}. Ve slabě kyselé oblasti se na vzniku koordinačních vazeb podílejí hlavně karboxylové skupiny a k nim se při vzrůstu pH nad 7 a po disociaci protonu z fenolického hydroxyly přidávají významně i tyto funkční skupiny. Stabilita vznikajících komplexů se vzrůstem pH obecně stoupá a to zejména u těch iontů (např. Cu^{2+}), které tvoří silné karboxylát-fenolické komplexy.

Kovalentní vazba. Interakce vedoucí ke vzniku kovalentních vazeb zde mohou být rozděleny na dvě skupiny – reakce probíhající bez využití aktivity enzymů a reakce s využitím biokatalýzy. Poznatky, že v makromolekulární struktuře huminových látek může docházet k trvalé fixaci kontaminantů kovalentní vazbou, je poměrně starý. Interakce kovalentního typu byla prokázána na přelomu 70. a 80. let minulého století^{28,29,63–65} a jejím příkladem zde může být kovalentní vazba anthracenu na huminových kyselinách izolovaných ze zeminy znečištěné směsí polyaromatických uhlovodíků. V metabolicky aktivním systému bylo zjištěno přibližně 40 % zabudování anthracenu (nesoucího izotop ^{14}C) do kovalentní formy ve struktuře huminových kyselin⁴³. Z hlediska sanace zemin kontaminovaných právě polyaromatickými uhlovodíky je potom možnost kovalentní vazby na huminové látky zvláště zajímavá, protože se zde jedná o stabilní vazbu na polymerní strukturu, o které je prokázáno⁶⁶, že je nemutagenní a v její přítomnosti dokonce i některé mutagenní látky snižují svou mutagenitu^{67,68}. Možnost vzniku kovalentní vazby mezi makromolekulární strukturou oxihumolitu a kontaminantem je z praktického hlediska předpokladem k imobilizaci kontaminantu. V této souvislosti je potom důležité, zdali proces vedoucí ke vzniku kovalentní vazby můžeme považovat za reversibilní nebo ireversibilní. V prvním případě by bylo možné uvažovat o regeneraci oxihumolitu, v případě ireversibilních reakcí je potom např. možné polutant ze sítě oxihumolitu odstranit způsobem biologickým.

Vodíkové můstky. I přes skutečnost, že přesná struktura huminových látek zůstává stále nedořešena, lze na základě prokázané přítomnosti některých funkčních skupin⁴² (amidová, laktamová, nitrilová) předpokládat možnost vzniku vodíkových můstků. Tyto vazby se i přes svůj nízký energetický obsah mohou význačně podílet na vazebných schopnostech mezi huminovými látkami a kontaminanty. Zastoupení vodíkových můstků na vazebných interakcích bylo objektivně prokázáno např. pro iminoskupiny v molekulách herbicidů^{68,69}.

Hydrofobní interakce. Tento typ vazby vzniká při

kontaktu nepolárních skupin (např. alkylových) nesených molekulami, které se nacházejí ve vodném roztoku, kde tyto interakce mohou např. vycházet z působení van der Waalsových sil nebo přesunu π elektronů. Hydrofobní interakce jsou nejčastější předpokládanou vaznou interakcí huminových látek s hydrofobními a alifatickými kontaminanty. Touto interakcí je např. vysvětlována skutečnost, že insekticid parathion ztrácí za přítomnosti huminových látek část své toxicity⁶². Vysvětluje se jí i imobilizace atrazinu a hydroxyatrazinu⁶⁹. Hydrofobní interakce jsou dále např. předpokládány v případě významné skupiny s-triazinových herbicidních látek^{30,31,67}.

5. Závěr

Huminové látky a oxihumolity se díky svým výhodným vlastnostem obecně jeví jako potenciálně vhodné pro detoxikaci kontaminujících látek přítomných v životním prostředí. Struktura přírodních huminových látek je vhodná pro sorpční, iontově výměnné a biodegradaci procesy. Přesto, že huminové látky jsou předmětem zájmu výzkumu déle než sto let, mnoho důležitých informací o těchto látkách není stále známo a problematika jejich chemické struktury není do současnosti zcela objasněna. Dokonalá znalost těchto látek je však nezbytně nutná pro širší uplatnění těchto látek v technologiích v oblasti životního prostředí.

Autoři děkují MPO ČR za finanční podporu (granty VaV ev. č. FD-K/086 a FD-K2/42).

Seznam zkratek

HS	huminové látky
HA	huminové kyseliny
FA	fulvokyseliny
HS _L	loužitelné huminové látky (opakované alkalické loužení při 70–80 °C)

LITERATURA

1. Stevenson F. J.: *Humus Chemistry*. Wiley, New York 1982.
2. Senesi M., Miano T. M. (ed.): *Humic Substances in the Global Environment and Implications on Human Health*. Elsevier, Amsterdam 1994.
3. Frimmel F. H., Christman R. F. (ed.): *Humic Substances and their Role in the Environment*. Wiley, New York 1988.
4. Schnitzer M., Khan S. U. (ed.): *Soil Organic Matter*. Elsevier, New York 1978.
5. Allison F. E.: *Soil Organic Matter and its Role in Crop Production*. Elsevier, Amsterdam 1973.
6. Waksman S. A.: *Humus*. Williams and Wilkins, Baltimore 1936.

7. Waksman S. A., Iyer K. R. N.: *Soil Sci.* 34, 43 (1932).
8. Prentice K., Fung I. Y.: *Nature* 346, 48 (1990).
9. Otto J. (ed.): *Ottáv naučný slovník*, sv. 11, 2. vyd. PASEKA a ARGO, Praha, (1996–2003).
10. Stevenson F. J.: *Biosci.* 22, 643 (1972).
11. Harworth R. D.: *Soil Sci.* 111, 71 (1973).
12. BrHayes M. H. B., McCarthy R., Malcolm R. L., Swift R. S. (ed.): *Humic Substances II. Search of Structure*. Wiley, New York 1989.
13. Schulten H. R., Plage B., Schnitzer M.: *Naturwissenschaften* 78, 311 (1991).
14. Adler E.: *Wood Sci. Technol.* 11, 169 (1977).
15. Saiz-Jimenez C.: *Proceedings of 6th IHSS Symposium: Humic Substances in the Global Environment and Implications on Human Health* (Senesi M., Miano T. M., ed.), str. 71. Elsevier, Amsterdam 1994.
16. MacCarthy P., Rice J. A.: *Proceedings of 6th IHSS Symposium: Humic Substances in the Global Environment and Implications on Human Health* (Senesi M., Miano T. M., ed.), str. 1209. Elsevier, Amsterdam 1994.
17. Thurman E. M., Malcolm R. L.: *Sci. Technol.* 15, 463 (1981).
18. Thurman E. M., Wershaw R. L., Malcolm R. L.: *Organic. Geochem.* 4, 27 (1982).
19. Parker W. O., Rausa R., Montanari L., Gesso C.: *Proceedings of 6th IHSS Symposium: Humic Substances in the Global Environment and Implications on Human Health* (Senesi M., Miano T. M., ed.), str. 1347. Elsevier, Amsterdam 1994.
20. Rausa R., Girardi E., Coleman V.: *Proceedings of 6th IHSS Symposium: Humic Substances in the Global Environment and Implications on Human Health* (Senesi M., Miano T. M., ed.), str. 1225. Elsevier, Amsterdam 1994.
21. Šebestová E., Machovič V., Pavlíková H.: *Proceedings of 6th IHSS Symposium: Humic Substances in the Global Environment and Implications on Human Health* (Senesi M., Miano T. M., ed.), str. 1359. Elsevier, Amsterdam 1994.
22. Kozler J., Novák J.: CZ Patent č. 285951 (1999).
23. Kozler L., Novák J., Pospíšil F., Drozdák K., Zadák Z.: CZ Patent č. 285919 (1999).
24. Pokorná L., Gajdošová D., Mikeška S., Havel J.: *Spec. Publ. R. Soc. Chem.* 259 (*Humic Substances*), 299 (2000).
25. Pokorná L., Gajdošová D., Havel J.: *Spec. Publ. R. Soc. Chem.* 247 (*Understanding Humic Substances*), 107 (2000).
26. Novák J., Kozler J., Janoš P., Čežíková J., Tokarová V., Madronová L.: *React. Funct. Pol.* 47, 101 (2001).
27. Abbt-Braun G., Frimmel F. H., Lipp P.: *Wasser Abwasser Forsch.* 24, 285 (1991).
28. Bollag J. M., Liu Shu-Yen, Minard R. D.: *Soil Sci. Soc. Am. J.* 44(1), 52 (1980).
29. Bollag J. M., Loll M. J.: *Experientia* 39(11), 1221 (1983).
30. Senesi N.: *Total Sci. Environ.* 123–124, 63–68 (1992).
31. Piccolo A.: *Proceedings of 6th IHSS Symposium: Humic Substances in the Global Environment and Implications on Human Health* (Senesi M., Miano T. M., ed.), str. 961. Elsevier, Amsterdam 1994.
32. Gerse J., Kremo R., Csikor J., Pinter L.: *Proceedings of 6th IHSS Symposium: Humic Substances in the Global Environment and Implications on Human Health* (Senesi M., Miano T. M., ed.), str. 1297. Elsevier, Amsterdam 1994.
33. Čežíková J., Kozler J., Madronová L., Novák J., Janoš P.: *React. Funct. Pol.* 47, 111 (2001).
34. Madronová L., Kozler J., Čežíková J., Novák J., Janoš P.: *React. Funct. Pol.* 47, 119 (2001).
35. Schulten H. R.: *Proceedings of 6th IHSS Symposium: Humic Substances in the Global Environment and Implications on Human Health* (Senesi M., Miano T. M., ed.), str. 43. Elsevier, Amsterdam 1994.
36. Schnitzer M.: *Proceedings of 6th IHSS Symposium: Humic Substances in the Global Environment and Implications on Human Health* (Senesi M., Miano T. M., ed.), str. 58. Elsevier, Amsterdam 1994.
37. Ballard T. M.: *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 35, 147 (1971).
38. Khan S. U., Schnitzer M.: *Geochim. Cosmochim. Acta* 36, 745 (1972).
39. Chiou C. T., Peters L. J., Freed V. H.: *Science* 206, 831 (1979).
40. Chiou C. T., Peters L. J., Freed V. H.: *Science* 213, 684 (1981).
41. Kyle B. G.: *Science* 198, 1683 (1981).
42. Steelink C.: *Proceedings of 6th IHSS Symposium: Humic Substances in the Global Environment and Implications on Human Health* (Senesi M., Miano T. M., ed.), str. 405. Elsevier, Amsterdam 1994.
43. Kästner M., Lotter S., Heerenklage J., Breuer-Jammali M., Stegmann R., Mahro B.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43, 1128 (1995).
44. Lee J. J., Chang S. M., Choi J.: *Hangue Toyang Piryo Hakholdi* 28, 114 (1995).
45. Fukushima M., Tanaka S., Nakamura H., Ito S.: *Talanta* 43, 383 (1996).
46. D'Orazio V., Loffredo E., Brunetti G., Senesi, N.: *Chemosphere* 39, 183 (1999).
47. Wershaw R. L.: *J. Contam. Hydrol.* 1, 29 (1986).
48. Kingery W. L., Simpson A. J., Hayes M. B. H., Locke M. A., Hicks R. P.: *Soil Sci.* 165, 483 (2000).
49. DeLeeuw J. W., Hatcher P. G.: *Naturwissenschaften* 79, 330 (1992).
50. Visser R. A.: *Nature* 204, 581 (1964).
51. Szilagyi M.: *Soil Sci.* 115, 434 (1973).
52. Steelink C., Tolin C., v knize: *Soil Biochemistry* (McLarren A. D., Peterson G. H., eds.), str. 147. Marcel Dekker, New York 1967.
53. Alberts J. J., Schindler J. E., Miller R. W., Nutter D. E.: *Sci.* 184, 895 (1974).
54. Mathur S. P.: *Soil Sci.* 111, 38 (1972).
55. Shin H. S., Moon H.: *Soil Sci.* 161(4), 250 (1996).

56. Kozler J.: Výzkumná zpráva č. VZ-S-1112. VÚAnCh, Ústí nad Labem 1994.
57. Kozler J.: Výzkumná zpráva č. VZ-S-1135. VÚAnCh, Ústí nad Labem 1996.
58. Kozler J.: Výzkumná zpráva č. VZ-S-1158. VÚAnCh, Ústí nad Labem 1997.
59. Kozler J.: Výzkumná zpráva č. VZ-S-1188. VÚAnCh, Ústí nad Labem 1997.
60. Horová D.: Výzkumná zpráva č. VZ-S-1349. VÚAnCh, Ústí nad Labem 2002.
61. Machovič V., Mizera J., Sýkorová I., Borecká L.: Acta Montana IRSM, ACS, Series B No. 10(117), 15 (2000).
62. Katan J., Fuhreman T. W., Lichtenstein E. P.: Sci. 193, 891 (1976).
63. Bollag J. M., Liu S. Y., Minard R. D.: Appl. Environ. Microbiol. 38, 90 (1979).
64. Bollag J. M., Liu S. Y., Minard R. D.: Soil Sci. Soc. Am. J. 44, 52 (1980).
65. Bollag J. M., Minard R. D., Liu S. Y.: Environ. Sci. Technol. 17, 72 (1983).
66. Gircher T., Badaev S. A., Pospíšil F., Velemínský J.: Mutat. Research 22, 937 (1990).
67. Sato T., Ose Y., Nagase H.: Mutat. Research 162, 173 (1986).
68. DeSimone C., Piccolo A., DeMarco A.: *Proceedings of 6th IHSS Symposium: Humic Substances in the Global Environment and Implications on Human Health* (Senesi M., Miano T. M., ed.), str. 1114. Elsevier, Amsterdam 1994.
69. Senesi N., D'Orazio V., Miano T. M.: Geoderma 66, 273 (1995).

L. Veselá^a, M. Kubal^b, J. Kozler^c, and P. Inne-manová^a (^a*Division of Remedial and Environmental Projects, Dekonta Co., Prague*, ^b*Department of Environmental Chemistry, Faculty of Environmental Technology, Institute of Chemical Technology, Prague*, ^c*Research Institute of Inorganic Chemistry, Ústí nad Labem*): **Structure and Properties of Natural Humic Substances of the Oxyhumolite Type**

Humic substances are naturally occurring organic compounds formed by decomposition of organic matter and by synthetic activities of microorganisms. Humic acids, fulvic acids and humin are major components of humic substances. Oxyhumolite (oxidised young lignite) is a natural, inert and non-toxic material, which can contain up to 90 % of biochemically active humic substances. One of the top-quality oxyhumolites is in the Czech Republic. Some of the North-Bohemian oxyhumolites contain more than 80 % of humic acids with low contents of bitumen (< 0.1 %) and inorganics. Due to their structure and suitable properties, these substances appear to be applicable in detoxication of contaminants present in the environment. Natural humic substances are suitable for sorption, ion exchange and biodegradation processes.

BIOSYNTÉZA, SEKRECE A DEGRADACE INSULINU

LENKA ŽÁKOVÁ a JIŘÍ JIRÁČEK

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo
nám. 2, 166 10 Praha 6
jiracek@uochb.cas.cz

Došlo 31.3.05, přijato 2.5.05.

Klíčová slova : insulin, biosyntéza, regulace, degradace

Obsah

1. Úvod
2. Biosyntéza insulinu
3. Genová regulace
4. Regulace sekrece
5. Degradace insulinu
6. Závěr

1. Úvod

Insulin je globulární protein o relativní molekulové hmotnosti cca 6000 Da, který se skládá ze dvou polypeptidových řetězců A a B stabilizovaných dvěma interchinárními disulfidickými můstky. Třetí intrachinární disulfidický můstek je v řetězci A. Interchinární disulfidické můstky se nacházejí mezi cysteiny A7 a B7 a mezi A20 a B19, intrachinární disulfidický můstek spojuje cysteiny A6 a A11 (obr. 1). Řetězec A má spíše kyselý charakter a je tvořen 21 aminokyselinami, řetězec B je naopak spíše bazický a tvoří jej 30 aminokyselin. Insulin produkovaný β -buňkami pankreatu je jedním z klíčových hormonů organismu a ovlivňuje řadu důležitých metabolických pochodů, přičemž mezi nejdůležitější patří regulace vstupu molekul glukosy do buňky. Porucha insulinové sekrece či působení insulinu je spojeno se závažnými klinickými projevy – nejčastěji s onemocněním diabetes mellitus 1. a 2. typu.

Primární struktura byla vyřešena v první polovině 50. let (cit.^{1,2}), sekundární a terciární struktura byla určena na konci šedesátých let^{3,4}. Charakteristická, evolučně velmi konzervovaná terciární struktura insulinu, vytvořená během biosyntézy a formování molekuly, je krucíálně důležitá pro jeho biologickou aktivitu. Při studiu biosyntézy se zjistilo, že insulin vzniká z jednořetězcového prekurzoru, ve kterém se vysoce efektivním způsobem vytváří správné propojení disulfidických můstků, a tím i pozdější terciární struktura hormonu⁵. Později bylo prokázáno, že model jednořetězcového prekurzoru je společný i pro mnoho dalších peptidových hormonů a neuropeptidů⁶. Příkladem může být proopiomelanokortin (POMC), ze kterého vzniká několik biologicky aktivních peptidů⁷.

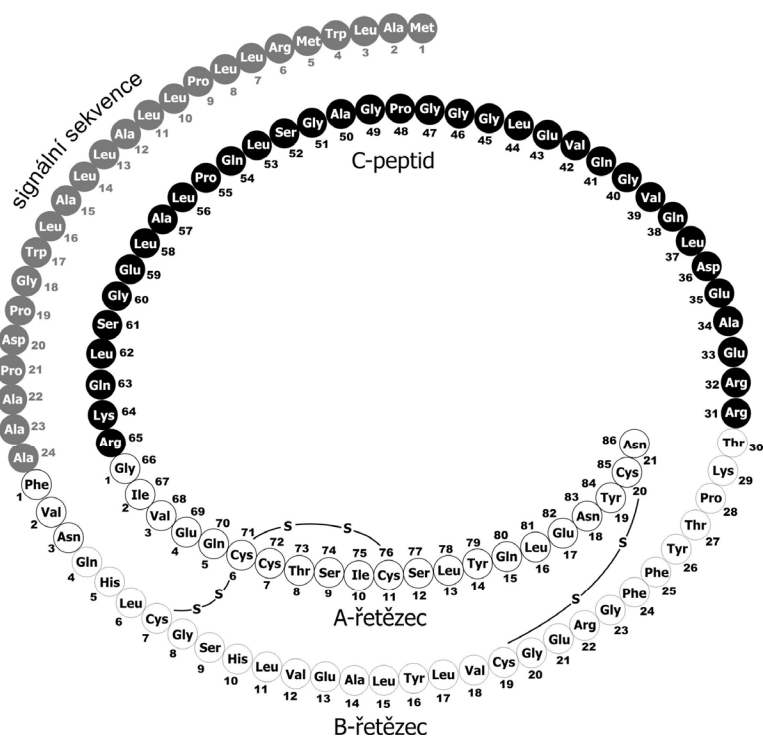
2. Biosyntéza insulinu

Insulin je syntetizován v β -buňkách Langerhansových ostrůvků pankreatu. β -Buňky, stejně jako všechny buňky secernující proteiny, obsahují drsné endoplasmatické retikulum a tvoří vezikuly (váčky) určené pro skladování proteinů. β -Buňky mají ještě jeden důležitý rys – u téměř všech živočichů jsou tyto buňky velice bohaté na zinek a vápník.

Biosyntéza insulinu (obr. 2) začíná na ribozomech drsného endoplasmatického retikula (RER), kde dochází k translaci preproinsulinu. Preproinsulin je prvotním prekurzorem insulinu, je to 12 kDa velká jednořetězcová molekula, která se skládá z 9 kDa proinsulinu, kterému na *N*-konci předchází 24 aminokyselin dlouhá tzv. signální sekvence⁸ (obr. 1). Signální sekvence usnadňuje transfer vznikajícího peptidu přes dvojvrstvou membránu do lumen endoplasmatického retikula. V signální sekvenci je množství hydrofobních aminokyselin, které jsou zapojeny do řady molekulárních interakcí nutných k této translokaci. Během translokace nebo těsně po ní dochází k odštěpení signální sekvence signální peptidasou, specifickou membránovou proteasou umístěnou na vnitřní straně RER (cit.⁹). Signální sekvence je následně v RER rychle degradována. Vzniklý proinsulin je pro další zpracování transportován v membránových váčcích, které protein chrání před cytoplasmatickým prostředím buňky směrem k cisternám Golgiho aparátu (GA).

Proinsulin se skládá ze tří částí; *N*-terminální část začíná *N*-koncem B-řetězce insulinu, následuje tzv. C-peptid obsahující 26–31 aminokyselin a molekula končí A-řetězcem insulinu. Savčí proinsulin má od 78 (psí) do 86 (lidský, koňský, potkaní) aminokyselin. Rozdíl ve velikosti je vždy způsoben délkou vmezeřeného C-peptidu¹⁰. Teoreticky není nutné, aby délka vmezeřeného C-peptidu byla 26–31 aminokyselin. Z výzkumů vyplývá, že pro správnou terciární strukturu proinsulinu a tudíž i insulinu je zapotřebí minimální délka spojovacího peptidu 5–8 aminokyselin¹¹. C-Peptid, který je společně s insulinem vylučován do krevního řečiště v ekvivalentním množství, má na rozdíl od obou dosti konzervovaných řetězců insulinu velkou variabilitu v aminokyselinovém složení. To naznačuje, že C-peptid nemá pravděpodobně žádnou fyziologickou funkci vně pankreatu, i když se o této otázce stále vedou diskuse¹².

Po translokaci a odštěpení signálního peptidu se molekula proinsulinu spontánně rychle složí do správné konformace a vytvoří disulfidické můstky, a tak se utvoří správná terciární struktura molekuly, která je transportována do GA pro další zpracování. Proinsulin je transportován v malých membránových váčcích z *cis* cisternen do *trans* cisternen GA, kde se proinsulin koncentruje v sekrečních granulích pučících z GA. Golgiho aparát hraje nezbytnou



Obr. 1. Sekvence a organizace řetězců v preproinsulinu (celá sekvence), proinsulinu (bílá a černá) a insulinu (bílá); uvedeno je číslování aminokyselin signální sekvence, i proinsulinu i insulinu

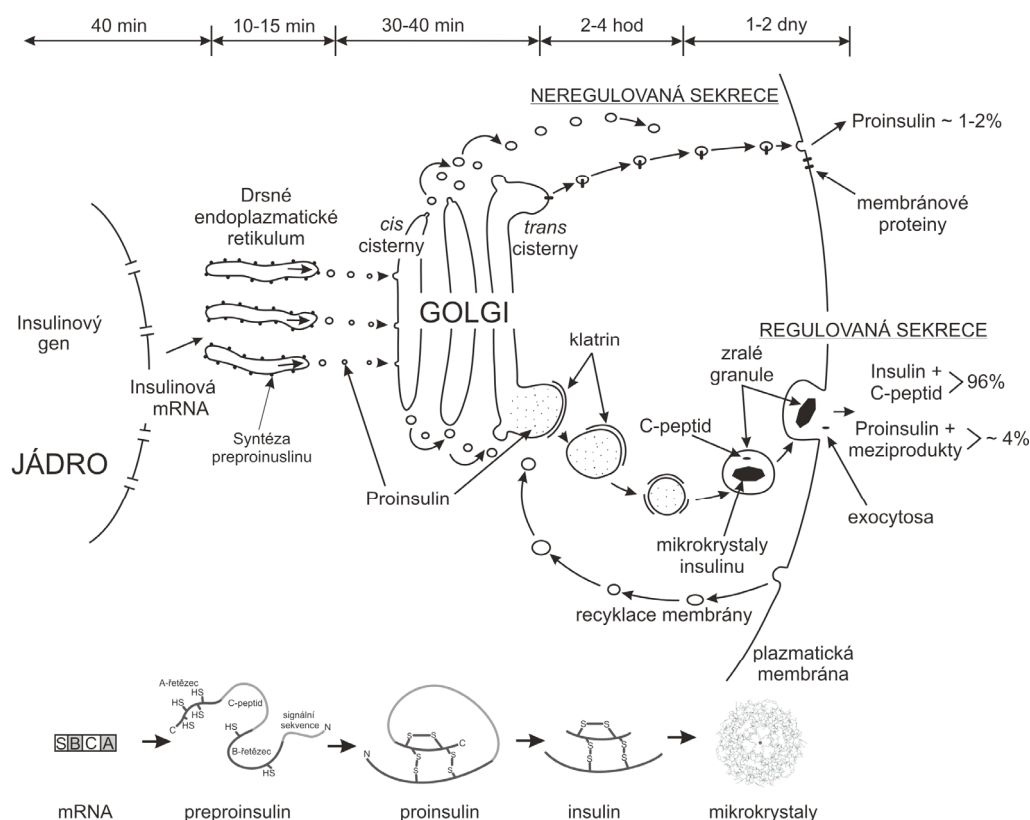
roli při zpracování a třídění proteinů ve všech sekrečních buňkách¹³. Sestává se z několika částí: v blízkosti RER jsou *cis* cisterny GA, které přecházejí přes *mid* cisterny GA až po *trans* cisterny GA, kde jsou prohormony štěpeny jejich proteasami a vznikají sekreční granule¹⁴.

Konverze proinsulinu začíná v *trans* cisternách GA a pokračuje v nově vytvořených sekrečních granulích. Proces trvá několik hodin, během kterých sekreční granule v cytosolu dozrají a jsou schopné sekrece insulinu. Nově vytvořené sekreční granule jsou charakteristické mnohem nižší hustotou svého obsahu než granule zralé.

Cytosolická část *trans* cisteren GA v místech, kde začínají pučet membránové granule s proinsulinem, bývá často pokryta klatrinem¹⁵. Klatrin je bílkovina, která částečně pokrývá i nezralé sekreční granule a postupně mizí se stupněm jejich zrání. Při spojení granulí s buněčnou membránou se již na povrchu granulí nevyskytuje¹⁶. V pankreatických β -buňkách jsou klatrinem pokryté nezralé granule mírně kyselé. V takových granulích je velké množství proinsulinu a málo insulinu. Jak granule dozrávají, stávají se více kyselé, což umožňuje aktivaci proteas uskutečňujících konverzi proinsulinu na insulin¹⁷. Současně s procesem konverze mizí pokrytí klatrinem. Ač se původně předpokládalo, že klatrin má hlavní význam při formování sekrečních granulí nebo při regulaci konverze proinsulinu či regulaci exocytosis, nyní se předpokládá, že jeho hlavní funkce spočívá ve zbavení zralých granulí konvertujících enzymů¹⁸.

Proinsulin v sekrečních granulích vytváří rozpustné hexamery, kdy je šest molekul proinsulinu koordinováno okolo zinečnatých iontů¹⁹. Bylo prokázáno, že proinsulin má 5× vyšší schopnost vázat zinek než insulin²⁰. Nicméně existuje několik druhů živočichů, jako je morče, nutrie a i jiní hlodavci²¹ a také např. ryba sliznatka²², kteří díky tomu, že v pozici B10 nemají histidin, potřebný pro vazbu zinku během agregace, nejsou schopni vytvářet hexamery proinsulinu nebo insulinu. Přítomnost zinečnatých iontů a stabilita hexameru naznačuje, že hexamerické uspořádání je s velkou pravděpodobností zachováno během celého procesu konverze. Pozice, kde dochází k odštěpení *N*-konce A-řetězce a *C*-konce B-řetězce od C-peptidu jsou stejně dobře exponovány v hexameru jako v monomeru, ale v hexameru jsou méně flexibilní²³.

Ve středu zrajících granulí se vytváří houstnoucí centrální jádro, ve kterém konvertovaný hexamerní insulin vytváří mikrokristaly²⁴. Krystalizaci insulinu napomáhá optimální hodnota pH uvnitř sekrečních granulí, která se pohybuje okolo 5,0–5,5 (cit.²⁵). Uprostřed zralých granulí jsou mikrokristaly insulinu obklopené volně se pohybujícím odštěpeným C-peptidem. U živočichů, jejichž insuliny nejsou schopny vytvářet hexamery, se insulin nevyskytuje ve formě mikrokristalů, ale ve formě amorfního precipitátu^{21,23}. Přítomnost krystalů v biologických procesech je nezvyklá a lze předpokládat, že má svou funkci. Jednou z těchto funkcí může být lepší ochrana krystalického insulinu před degradujícími enzymy. Další funkcí může být



Obr. 2. **Biosyntéza a sekrece insulinu v β -buňkách pankreatu**; v horní části obrázku je znázorněna časová závislost a v dolní části schéma biosyntézy od mRNA po mikrokrystaly hexamerního insulinu (upraveno podle^{33,85})

snaha o úplnou konverzi hexamerního proinsulinu v insulin. Hotový insulin na rozdíl od proinsulinu krystalizuje, a to pomáhá výborné efektivitě konverze, která je až 95 % (cit.¹⁹). Tato teorie ovšem nebyla zatím ověřena²⁶.

Všechny známé proinsuliny mají pár basických aminokyselin spojujících C-peptid s řetězcí insulinu²⁷. C-Konec B-řetězce a N-konec C-peptidu spojuje nejčastěji dipeptid Arg-Arg a C-konec C-peptidu s N-koncem A-řetězce spojuje dipeptid Lys-Arg. K vyštěpení C-peptidu a konečné konverzi proinsulinu na insulin je zapotřebí dvou enzymů²⁸. Jedním z nich je endopeptidasa se specifitou podobnou trypsinu, tzv. „trypsin-like“ enzym, který štěpí proinsulin za páry basických aminokyselin, tj. u lidského proinsulinu za Arg32 a za Arg65 (obr. 1). Druhým enzymem je exopeptidasa se specifitou podobnou karboxypeptidase B, tzv. „karboxypeptidase B-like“ enzym, která odstraňuje z C-konce B-řetězce a C-konce C-peptidu dvě basické aminokyseliny, v případě konverze lidského proinsulinu aminokyseliny Arg31, Arg32 a Lys64, Arg65 (cit.²⁵). Tato exopeptidasa byla původně objevena v několika neuroendokrinních tkáních, a proto může nést i označení karboxypeptidasa H²⁹, enkefalin konvertasa, či více užívané karboxypeptidasa E (CPE)³⁰.

Během konverze proinsulinu na insulin se vytvářejí dva meziprodukty, a to proinsulin s vyštěpeným aminoky-

selinami Arg31 a Arg32 (des-31,32-proinsulin) nebo proinsulin s vyštěpenými aminokyselinami Lys64 a Arg65 (des-64,65-proinsulin) (obr. 1), přičemž poměr obou meziproduktů je 60–70 % des-64,65-proinsulinu a 30–40 % des-31,32-proinsulinu³¹. K transportu proinsulinu z RER, přes GA až do sekrečních granulí je zapotřebí energie, ale vlastní proteolytická konverze proinsulinu na insulin je děj nezávislý na dodané energii³².

V prostředí sekrečních granulí jsou hexamery insulinu velice stálé. Jestliže jsou ale vyplaveny do krevního řečiště, musí insulin přejít z pH okolo 5,5 (sekreční granule) do pH 7,4 (krev). V hexameru je šest glutamových kyselin v pozici B13 koordinováno okolo centra hexameru a pomáhají vzájemnými interakcemi udržovat jeho stabilitu, která je největší okolo pH 6. V krvi jsou tyto interakce nestabilní, protože dochází k deprotonaci karboxylu, a tím k ztrátě koordinace okolo zinečnatých iontů. To způsobí rozpad krystalů v krevním séru¹⁹.

Insulin je secernován z β -buňek pankreatu exocytosou. Při tomto procesu zralé granule migrují k vnější membráně podél mikrotubulární sítě uvnitř buněk. V blízkosti buněčné membrány se mikrotubuly spojují s mikrofilamenty, jež bezprostředně přiléhají k buněčné membráně. Jakmile sekreční granule doputují k buněčné membráně, dojde k splynutí jejich membrán a dojde k vylití obsa-

hu granulí ven z buňky. Exocytosa je děj závislý na energii a je řízena zejména hladinou glukosy v krvi.

Malé množství proinsulinu, okolo 1–2 %, je uvolněno z β -buněk tzv. neregulovanou sekrecí, tj. proinsulin uvolňovaný v malých váčcích vytvořených v různých částech Golgiho aparátu (obr. 2).

Ačkoliv insulin i jeho prekurzor proinsulin mají různé veliké molekuly, jsou si podobné v mnoha vlastnostech, jako jsou schopnost agregace, isoelektrický bod, rozpustnost či schopnost reakce s protilátkami proti insulinu³³. Biologický poločas proinsulinu je okolo 20 min, insulinu okolo 5 min (cit.³⁴). Přes podobné vlastnosti je biologická aktivita proinsulinu velice nízká, 3–5 % biologické aktivity insulinu. Takto nízká aktivita je způsobena tím, že vmezeřený C-peptid zabraňuje insulinu přejít do své aktivní konformace, která vyžaduje vysokou flexibilitu C-konce B-řetězce a jeho oddálení od N-konce A-řetězce³⁵. N-Konec A-řetězce, který je v proinsulinu vzdálen od C-konce B-řetězce pouze 8 Å tak nemá možnost reagovat s insulinovým receptorem a spustit tak kaskádu signalizačních dějů vedoucích ke vstupu molekul glukosy do nitra insulinsenzitivní buňky. Přehledný článek o problematice interakce insulinu s jeho receptorem jsme publikovali v tomto časopise v roce 2002 (cit.³⁶).

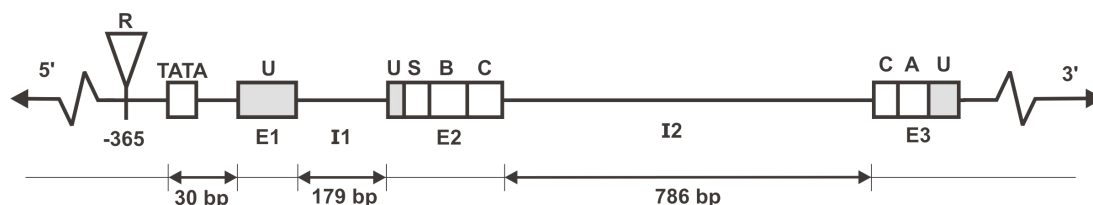
3. Genová regulace

Transkripce insulinového genu v β -buňkách pankreatu je regulována specifickými variabilními sekvencemi DNA lokalizovanými na 5' konci genu. Rozpoznáním těchto specifických DNA úseků proteinovými faktory přítomnými pouze v β -buňkách pankreatu se spustí selektivní transkripce genu.

Insulinový gen byl poprvé charakterizován v roce 1977 (cit.³⁷). Od té doby byly charakterizovány insulinové geny různých živočišných druhů. Většina živočišných druhů má pouze jednu kopii genu pro insulin^{37,38}, obsahující 3 exony oddělené 2 introny (obr. 3). Potkani a myši mají dva různé geny pro insulin, jež jsou si, vyjma chybějícího druhého intronu u jednoho z nich, podobné. U myši jsou oba geny lokalizované na dvou chromosomech, kdežto potkan má oba geny na jednom chromosome vzdálené od sebe přibližně 100 000 kb (cit.³⁹). Lidský insulinový gen je

umístěn na krátkém raménku chromozomu 11 v regionu p15 (cit.⁴⁰), je veliký asi 19 kb a obsahuje 1430 párů bází (bp). Genu pro insulin na chromosome předchází gen kódující tyrosinhydroxylasu ve vzdálenosti 2,7 kb a za ním ve vzdálenosti 1,6 kb následuje gen kódující insulin-like growth faktor II (IGF-II)⁴¹.

Sekvenční porovnání mezi různými geny kódujícími insulin u obratlovců ukazují, že mutace vedoucí k aminokyselinové substituci jsou mnohem méně časté u oblastí kódujících A a B řetězec než u oblastí kódujících C-peptid a signální sekvenci. Ačkoliv introny, které obsahuje insulinový gen, mají různou sekvenci a délku, která může být od 119 bp (morče a potkan – intron 1) až po více než 3500 bp (kuře – intron 2), umístění obou intronů je vysoce konzervováno. Intron 1 je umístěn v 5' ne-translatované části a intron 2 rozděluje sekvenci kódující aminokyseliny 6 a 7 v C-peptidu. Sekvence promotoru je lokalizovaná 22–24 bp před transkripčním startem a terminační signál je umístěn 20 nukleotidů před poly(A)-koncem mRNA. Gen pro lidský insulin má několik vlastností, které insulinové geny ostatních živočichů nemají. Jednou z těchto vlastností je unikátní repetitivní sekvence umístěná na 5' konci v pozici –365 sestávající se z různého počtu opakování 14–15 bp, které sice nemají vliv na expresi genu, ale mohou být užitečným ukazatelem pro genetické analýzy⁴². Dřívější studie porovnávaly přítomnost většího (třída 3) nebo menšího počtu (třídy 1 a 2) těchto opakování v souvislosti s výskytem diabetu a aterosklerózy. Ukázalo se, že lidé s alelami třídy 1 mají mnohem větší sklon k onemocnění diabetem typu I, a proto může tento úsek být důležitým genetickým příznakem u rizikových pacientů⁴³. V průběhu let bylo identifikováno několik genetických mutací lidského genu pro insulin. Jedná se o neaktivní insuliny, které byly vždy nazvány podle místa nálezu těchto mutantů, a to insulin Los Angeles, insulin Chicago a insulin Wakayama⁴⁴. Jedná se vždy o záměnu jedné aminokyseliny, v případě insulinu Chicago je to záměna PheB25 → LeuB25, v případě insulinu Los Angeles PheB24 → SerB24 a v případě insulinu Wakayama je to záměna ValA3 za LeuA3. Nízká biologická aktivita těchto mutantů je způsobena tím, že všechny substituce jsou v pozicích, které jsou přímo zodpovědné za vazbu insulinu na jeho receptor.



Obr. 3. **Struktura lidského insulinového genu** (upraveno podle⁴⁴); gen obsahuje 3 exony E1–E3 a dva introny I1 a I2. Trojúhelníkem s označením R je na 5' konci označeno umístění unikátní repetitivní sekvence 14–15 opakování. U je označení pro ne-translatovanou část genu, S označuje sekvenci kódující signální sekvenci, B a A části kódující insulinové řetězce a C část kódující C-peptid

4. Regulace sekrece

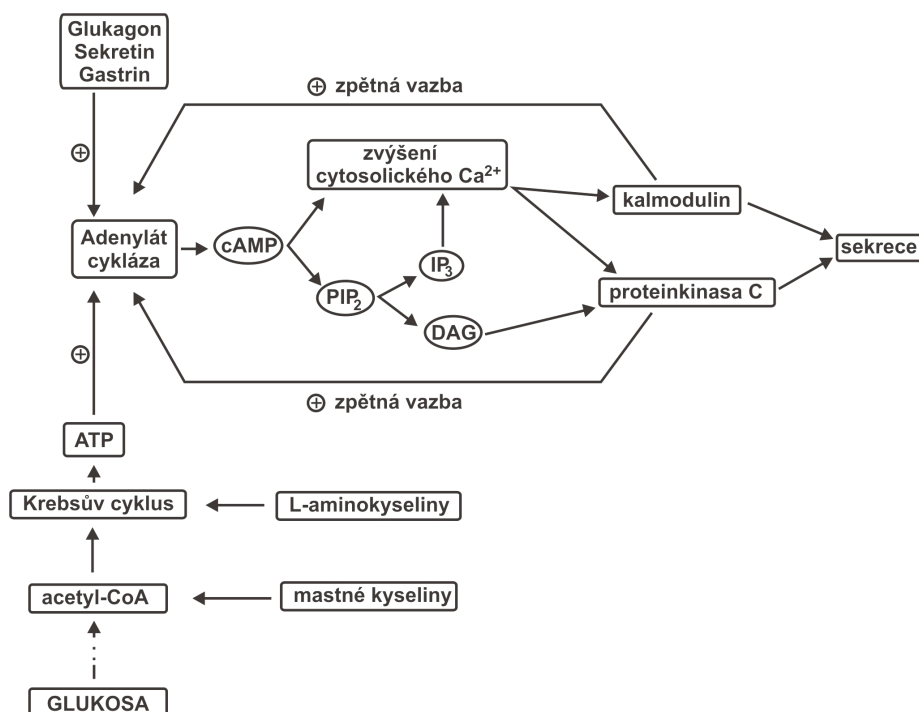
Regulace skladování a sekrece insulinu v β -bunčkách pankreatu je velice důležitá pro zachování normální homeostasy v organismu. Sekrece insulinu je regulována hlavně koncentrací D-glukosy v intestinální tekutině obklopující buňky Langerhansových ostrůvků. Nejen hladina glukosy v krvi ovšem kontroluje celé hospodaření organismu s insulinem. Jde o spleť mechanismusů, ve kterém mají významnou roli i jiné živiny přijaté potravou a také některé hormony a neurotransmitery⁴⁵.

Aktivátorem pro biosyntézu insulinu je nejen glukosa, ale i některé L-aminokyseliny, mastné kyseliny a ketonové látky. Všechny tyto látky ovšem podněcují sekreci pouze v přítomnosti glukosy. Typickou odpovědí na maximální fyziologický podnět je sekrece insulinu ve dvou fázích. První fáze sekrece nastupuje během 4–6 min, je silná a rychle opadá. Za touto fází nastupuje druhá fáze, kde sekrece insulinu pomalu roste a trvá i několik desítek minut do doby, než se ustálí hladina glukosy v krvi⁴⁶.

Na fyziologický stimul reagují β -buňky složitým mechanismem, při kterém hrají významnou roli vápenaté ionty, cyklické AMP a řada vnitrobuněčných proteinů (obr. 4). Normální koncentrace glukosy v krvi je okolo 5 mmol l^{-1} . Na zvýšenou hladinu glukosy nebo jiný fyziologický podnět reagují β -buňky zvýšením koncentrace vápenatých iontů v cytosolu. To je jeden z klíčových kroků pro následné uvolnění insulinu⁴⁷. Bez přítomnosti ex-

tracelulárního Ca^{2+} není sekrece insulinu z β -buněk možná. Zvýšení koncentrace vnitrobuněčných Ca^{2+} iontů jejich transportem z extracelulárního prostoru dovnitř buňky vyvolává zvýšení poměru ATP/ADP uvnitř buňky. Toto zvýšení poměru ATP/ADP podnítl uzavření membránových K^+ kanálů závislých na ATP a to následně sníží odtok K^+ iontů z buňky. To způsobí depolarizaci plasmatické membrány, která vede k otevření kanálů pro Ca^{2+} . Zvýšení koncentrace Ca^{2+} iontů v cytosolu vede přes aktivaci různých proteinkinás ke kontrakci mikrotubulární a mikrofilamentové buněčné soustavy, která mechanismem podobným svalové kontrakci traslokuje sekreční granule k místům exocytózy na buněčné membráně⁴⁸. Nastolení původního stavu je docíleno jednak ATPasou citlivou na kalmodulin a jednak působením transportního systému $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ iontů. Aktivita cytosolického Ca^{2+} může také přímo nebo prostřednictvím kalmodulinu participovat na aktivaci dalších buněčných systémů, jako Ca-ATPasy, adenylátcyklasy, fosfodiesterasy, proteinkinasy C a fosfolipasy C.

S hospodařením s Ca^{2+} uvnitř buňky úzce souvisí systém jiného druhého posla, a to cAMP. Cyklické AMP hraje v regulaci sekrece insulinu důležitou roli, nicméně jeho hladina není v tomto mechanismu klíčovým faktorem. Bylo prokázáno, že cAMP působí na uvolňování insulinu do krve, ale pouze v přítomnosti vyšších koncentrací krevní glukosy. Jiné látky zvyšující hladinu cAMP, jako jsou např. forskolin, kofein nebo theofylin nejsou bez přítomnosti vyšší hladiny krevní glukosy schopny ovlivnit uvolnění insulinu⁴⁹.



Obr. 4. Schématické znázornění nejdůležitějších regulačních drah insulinové sekrece

Mechanismus, jakým cAMP působí, byl dlouho nejasný, ale nakonec se prokázalo, že cAMP ovlivňuje hlavně tok vápenatých iontů. Zvýšená hladina cAMP zvýší vtok Ca^{2+} iontů dovnitř buňky a také cAMP ovlivňuje distribuci Ca^{2+} iontů uvnitř buňky ve prospěch jejich akumulace v cytosolu. Vtok vápenatých iontů do buněk iniciuje jednak fosforylaci proteinů a jednak přímo ovlivňuje K^+ kanály, což vede k depolarizaci membrány, jak bylo diskutováno výše. Role cAMP je tedy hlavně v ovlivňování koncentrace vápenatých iontů uvnitř buňky tak, aby tyto ionty umožnily sekreci insulinu do krevního řečiště.

Hladina cAMP je regulována enzymy adenylátcyklasou a fosfodiesterasou. Adenylátcyklasa, lokalizovaná na plasmatické membráně, je aktivována některými hormony, mezi jinými také antagonistou insulinu glukagonem. Je také aktivována kalmodulinem, který v tomto mechanismu hraje pozitivní zpětnou vazbu po aktivaci Ca^{2+} ionty (obr. 4). Při velmi vysokých koncentracích Ca^{2+} iontů kalmodulin naopak zvyšuje aktivitu fosfodiesterasy, která inhibuje cAMP. Vápenaté ionty tedy ovlivňují hladinu cAMP, kdy jejich vyšší koncentrace prostřednictvím kalmodulinu zvyšují hladinu cAMP a naopak velmi vysoké koncentrace hladinu cAMP snižují⁴⁵.

Adenylátcyklásový systém je úzce spjat s fosfoinositolovou kaskádou. Je již dobře známo, že některé složky potravy jsou schopny aktivovat fosfolipasu C, membránový enzym, který hydrolyzuje fosfoinositol-4,5-bisfosfát (PIP_2) na fosfoinositol-1,4,5-trifosfát (IP_3) a diacylglycerol (DAG). Ve vodě rozpustný IP_3 , jako druhý posel difunduje k ER, z něhož uvolní do cytoplazmy Ca^{2+} . Méně polární DAG, který zůstane v plasmatické membráně, působí jako druhý posel na proteinkinasu C, která fosforyluje celou řadu různých proteinů, a tím mění jejich aktivitu⁴⁵. Uvažuje se, že zatímco systém Ca^{2+} iontů jako spouštěčů insulinové sekrece je zodpovědný za první fázi insulinové sekrece, tak fosfoinositolový systém ovlivňuje její druhou fázi⁴⁵. Jakákoliv porucha v jednotlivých kaskádách těchto kontrolních mechanismů se může podílet na vzniku diabetu či jiného závažného onemocnění.

Během glykolýzy a Krebsova cyklu mohou do děje vstupovat a zvyšovat tvorbu ATP i mastné kyseliny a L-aminokyseliny (např. leucin), a tím následně cestou aktivace adenylátcyklasy ovlivňovat vzestup intracelulárního Ca^{2+} (cit.⁵⁰) (obr. 4).

Glukosa také mimo jiné přímo stimuluje biosyntézu insulinu podnícením translace mRNA⁵¹. Insulinová mRNA je normálně velmi stabilní, s biologickým poločasem okolo 30 h. Zvýšení hladiny krevní glukosy zvyšuje její poločas přibližně třikrát, a to společně s vystupňováním transkripce má za následek zvýšení hladiny mRNA na dobu 48–72 h. Tento mechanismus vysoce navýší produkci insulinu⁵² a je schopen reagovat na zvýšenou hladinu glukosy v rozmezí minut, přičemž důsledky této stimulace trvají několik hodin.

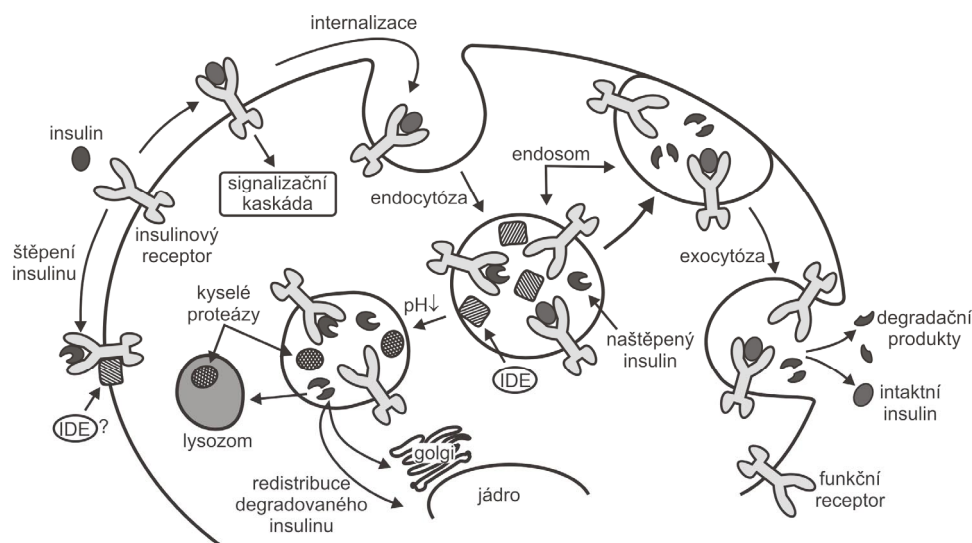
5. Degradace insulinu

Degradace insulinu je velmi složitý proces. Insulin, jak už bylo řečeno, má v krevní plazmě velmi krátký biologický poločas, který se pohybuje mezi 4–6 minutami. Takto krátký biologický poločas je důležitý pro velmi pohotovou regulaci hladiny krevní glukosy.

Asi před 50 lety bylo poukázáno na existenci enzymu s vysokou specifitou k degradaci insulinu. Byl nazván insulinasa⁵³. Později byla ale existence insulinasy zpochybněna a prokázalo se, že jde o směs různých proteolytických enzymů. Později se ukázalo, že za majoritní degradaci insulinu je pravděpodobně zodpovědná pouze jediná proteasa, která může insulin štěpit bez nutnosti rozštěpení disulfidických můstků. Tento enzym se vyskytuje v mnoha tkáních⁵⁴ a za léta výzkumu v různých laboratořích dostal mnoho názvů od insulinasy, přes insulysin až po insulin proteasu (IP)^{55,56}. Na konci 80. let se název ustálil na insulin degradujícím enzymu, se zkratkou IDE. Jedná se o metaloproteasu se Zn^{2+} v aktivním místě⁵⁷. Insulin je substrát IDE s nejvyšší afinitou ($K_m \sim 20$ nM), IDE ale může štěpit i mnoho jiných peptidů a proteinů, jako např. glukagon⁵⁸, ANP (atrial natriuretic peptide)⁵⁹ a IGF-II (insulin-like growth factor II)⁶⁰. IDE štěpí široké spektrum proteinů podobné velikosti a pro proteolýzu nevyžaduje specifickou aminokyselinovou sekvenci⁵⁸. Předpokládá se, že IDE rozeznává specifickou terciární strukturu proteinů, tzn. že váže a degraduje pouze proteiny s vhodným prostorovým uspořádáním aminokyselin^{61,62}. Plocha kontaktu IDE se substrátem je poměrně velká a zahrnuje značné množství interakcí. Tento enzym váže také IGF-I (insulin-like growth factor I), proinsulin, EGF (epidermal growth factor) s relativně vysokou afinitou, ale má velice nízkou schopnost tyto proteiny štěpit⁶³. IDE byl identifikován v peroxisomech, v cytosolu⁶³, v endosomech a částečně i na plasmatické membráně buněk⁶⁴.

Druhým enzymem, který pravděpodobně hraje důležitou roli v insulinové degradaci je glutathion insulin transhydrogenasa (GIT)⁶⁵, dnes nazývaná proteinová disulfidová isomerasa (PDI)⁶⁶. Uplatnění tohoto enzymu v degradaci insulinu je stále diskutabilní⁶⁷. Primární role PDI je při syntéze proteinů obsahujících disulfidové vazby. V endoplasmatickém retikulu PDI jako chaperon pomáhá těmto proteinům vytvořit správné disulfidové můstky a tím zaujmout správnou terciární strukturu⁶⁸. V případě insulinu se naopak předpokládá, že PDI redukuje disulfidické můstky částečně proteolyticky štěpeného insulinu.

Primární místo insulinové degradace je v játrech, kde se metabolizuje přibližně 80 % cirkulujícího insulinu. Množství metabolizovaného insulinu je variabilní na aktuálních fyziologických či patofyziologických podmínkách. Druhé nejvýznamnější místo insulinové degradace jsou ledviny. Ty odbourávají téměř 50 % insulinu cirkulujícího v periferním oběhu. Nadto ledviny odbourávají okolo 50 % cirkulujícího proinsulinu a 70 % C-peptidu mechanismem



Obr. 5. Schéma degradace insulinu

glomerulární filtrace⁶⁹. Třetí nejdůležitější tkáň pro vazbu a odbourávání je sval. K degradaci insulinu dochází i v adipocytech, fibroblastech nebo lymfocytech^{70–72}. Některé tkáně mají schopnost nejen vázat a degradovat insulín, ale i uvolňovat ho intaktní zpět do cirkulace⁷³.

Prvním krokem degradace insulinu je vazba hormonu na insulínový receptor umístěný na buněčné membráně⁷⁴ (obr. 5). Tato vazba spustí buněčnou odpověď, kterou je kaskáda signálních dějů, jejichž hlavním důsledkem je vstup molekul glukosy do nitra buňky. Tato vazba také spustí degradační proces insulinu. Insulínový receptor sám o sobě insulín nedegraduje, ale vystavuje ho působení IDE. Insulín se degraduje v naprosté většině případů navázaný na receptor. Podstatná část insulinu se degraduje po internalizaci insulínového receptoru s navázaným insulínem intracelulárně v endosomech. Ještě před internalizací se malá část navázaného insulinu zcela nebo částečně degraduje přímo na plasmatické membráně pravděpodobně také za přispění IDE, pro kterou je insulín navázaný na receptor výborným substrátem⁷⁵. Určitá část insulinu se i z vnitřku buňky vrací nedotčená nebo částečně degradovaná zpět do krevního oběhu. Takovýto insulín se může znovu vázat na svůj receptor a ovlivňovat metabolismus glukosy⁷⁶.

Po internalizaci insulínového receptoru s navázaným hormonem začíná degradace insulinu v endosomech. Internalizace je jednou z vlastností insulínového receptoru. Ten má v blízkosti membrány oblast nazvanou NPEY podle aminokyselinové sekvence, která je součástí všech internalizujících se receptorů. Přes přítomnost uvedené sekvence je hlavním požadavkem pro internalizaci fosforylace tyrosinových zbytků v intracelulární části receptoru⁷⁷. Ačkoliv se dříve předpokládalo, že se internalizovaný insulín začíná degradovat po spojení endosomů s lysosomy, je nyní známo, že proces degradace začíná už v raných stádiích

tvorby endosomů⁷⁸. Po vytvoření endosomů dojde v jejich nitru působením protonových pump k rychlému okyselení prostředí, což způsobí disociaci insulinu z receptoru. Degradací proces ale začíná už před okyselením endosomů působením IDE, která je v endosomech přítomna a vyžaduje neutrální prostředí⁷⁹. Po okyselení se na degradaci začínají podílet kyselé proteázy⁸⁰. V endosomech je odbouráno nejvýše 50 % insulinu⁸¹. Zbýlý insulín je transportován do jiných částí buňky, včetně jádra, cytosolu nebo lysosomů. Mechanismus, jakým insulín přechází do jiných buněčných organel, není znám, nicméně je i tento proces spojený s vnitrobuněčným působením IDE (cit.⁷³).

Kyselé proteázy jsou pro úplnou degradaci insulinu nezbytné. V kyselém prostředí ($\text{pH} \leq 6$) IDE ztrácí svou proteolytickou aktivitu a právě kyselé proteázy, které jsou aktivní po okyselení endosomů a jsou přítomny také v lysosomech, dokončují odbourání částečně naštěpeného insulinu. Mezi tyto proteázy patří tzv. endosomální kyselá insulinasa (EAI), o níž se předpokládá, že má na degradaci insulinu velký podíl^{63,80,82,83}.

Místa insulinu primárně štěpená IDE už byla identifikována a jelikož IDE rozeznává insulín podle jeho terciární struktury, je většina štěpených míst na povrchu molekuly. Na počátku dochází pravděpodobně ke štěpení vazeb AlaB14-LeuB15, PheB24-PheB25 a PheB25-TyrB26. Dalšími štěpenými vazbami jsou SerB9-HisB10, HisB10-LeuB11, GluB13-AlaB14 a TyrB16-LeuB17. Poté dochází k redukci disulfidových vazeb, pravděpodobně enzymem PDI. Tím vznikne neporušený A-řetězec a několik fragmentů B-řetězce^{81,84}. Téměř současně dochází ke štěpení A-řetězce mezi LeuA13 a TyrA14. Tato místa štěpení odpovídají specifitě metaloproteas pro velké alifatické nebo nepolární aminokyseliny.

V parenchymatických buňkách jater byla v endosomech prokázána vysoká aktivita EAI, jež může v těchto

buňkách působit místo IDE. I když jde o enzym, který není IDE příbuzný, není metaloproteasa a má pH optimum 4–4,5, místa štěpení jsou téměř identická s IDE (cit.⁸²). EAI je některými autory ztotožňována s katepsinem D (cit.⁸³). Insulinové fragmenty, ať už vzniklé působením IDE či kyselých proteas, jsou dále štěpeny různými proteolytickými systémy včetně lysosomů.

Dlouhou dobu byla diskutována role lysosomů v degradaci insulinu. Ačkoliv byly v lysosomech prokázány degradační produkty insulinu, soudilo se, že lysosomy nehrají v degradaci téměř žádnou roli. Je pravděpodobné, že částečně degradovaný insulin může být posléze v lysosomech dokonale rozštěpen⁷³.

Abnormality v odbourávání a degradaci insulinu se odrážejí v různých patologických stavech, mezi něž patří např. diabetes 2. typu nebo obezita.

Bohužel, dodnes neexistují vysoce selektivní inhibitory IDE ani EAI (katepsinu D). Jejich použití *in vivo* by umožnilo další zajímavý výzkum role degradujících enzymů v metabolismu insulinu na hladinu glukosy v krvi a nelze vyloučit jejich případné terapeutické využití.

6. Závěr

Uplynulo již více než 80 let od objevu insulinu a jeho podání prvním pacientovi. V průběhu následujících desetiletí byla vyřešena struktura insulinu a připraveno několik analogů používaných dnes v klinické praxi. Bylo rovněž dosaženo významných objevů týkajících se mechanismu působení insulinu, jeho interakce s receptorem a následných vnitrobuněčných dějů vedoucích ke vstupu glukosy do buňky. Přes všechny tyto objevy a úspěchy stále představuje diabetes mellitus jednu z nejvýznamnějších civilizačních chorob, která je spojena s vysokou morbiditou a mortalitou. Studium sekrece insulinu, regulace jeho exprese, degradace a mechanismu působení proto stále je a v budoucnu bude velmi aktuálním tématem. V této práci jsme se pokusili shrnout poslední znalosti z těchto oblastí výzkumu a doufáme, že článek bude inspirací pro naši chemickou a biochemickou veřejnost.

Tato práce byla podporována výzkumným záměrem Z4 055 0506.

LITERATURA

1. Ryle A. P., Sanger F., Smith L. F., Kitai R.: *Biochem. J.* 60, 541 (1955).
2. Sanger F.: *Nature* 171, 1025 (1953).
3. Adams M. J., Blundell T. L., Dodson E. J., Dodson G. G., Vijayan M., Baker E. N., Harding M. M., Hodgkin D. C., Rimmer B., Sheat S.: *Nature* 224, 491 (1969).
4. Peking Insulin Structure Group: *Peking Rev.* 40, 11 (1971).
5. Steiner D. F., Cunningham D., Spigelman L., Aten B.: *Science* 157, 697 (1967).
6. Douglass J., Civelli O., Herbert E.: *Annu. Rev. Biochem.* 53, 665 (1984).
7. Eipper B. A., Mains R. E.: *Endocr. Rev.* 1, 1 (1980).
8. Chan S. J., Keim P., Steiner D. F.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 73, 1964 (1976).
9. Walter P., Gilmore R., Blobel G.: *Cell* 38, 5 (1984).
10. Steiner D. F., Docherty K., Carroll R.: *J. Cell. Biochem.* 24, 121 (1984).
11. Liu M., Ramos-Castaneda J., Arvan P.: *J. Biol. Chem.* 278, 14798 (2003).
12. Steiner D. F., Rubenstein A. H.: *Science* 277, 531 (1997).
13. Farquhar M. G., Palade G. E.: *J. Cell Biol.* 91, 77s (1981).
14. Steiner D. F., Quinn P. S., Chan S. J., Marsh J., Tager H. S.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 343, 1 (1980).
15. Orci L., Glick B. S., Rothman J. E.: *Cell* 46, 171 (1986).
16. Orci L., Halban P., Amherdt M., Ravazzola M., Vassalli J. D., Perrelet A.: *Cell* 39, 39 (1984).
17. Orci L., Halban P., Perrelet A., Amherdt M., Ravazzola M., Anderson R. G.: *J. Cell Biol.* 126, 1149 (1994).
18. Molinete M., Dupuis S., Brodsky F. M., Halban P. A.: *J. Cell Sci.* 114, 3059 (2001).
19. Dodson G., Steiner D.: *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8, 189 (1998).
20. De P. J., Galansino G.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 121, 501 (1966).
21. Blundell T. L., Dodson G. G., Hodgkin D. C., Mercola D. A.: *Adv. Protein Chem.* 26, 279 (1972).
22. Cutfield J. F., Cutfield S. M., Dodson E. J., Dodson G. G., Emdin S. F., Reynolds C. D.: *J. Mol. Biol.* 132, 85 (1979).
23. Emdin S. O., Dodson G. G., Cutfield J. M., Cutfield S. M.: *Diabetologia* 19, 174 (1980).
24. Michael J., Carroll R., Swift H. H., Steiner D. F.: *J. Biol. Chem.* 262, 16531 (1987).
25. Kemmler W., Steiner D. F., Borg J.: *J. Biol. Chem.* 248, 4544 (1973).
26. Carroll R. J., Hammer R. E., Chan S. J., Swift H. H., Rubenstein A. H., Steiner D. F.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 85, 8943 (1988).
27. Steiner D. F., Cho S., Oyer P. E., Terris S., Peterson J. D., Rubenstein A. H.: *J. Biol. Chem.* 246, 1365 (1971).
28. Docherty K., Carroll R. J., Steiner D. F.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 79, 4613 (1982).
29. Davidson H. W., Hutton J. C.: *Biochem. J.* 245, 575 (1987).
30. Fricker L. D.: *Annu. Rev. Physiol.* 50, 309 (1988).
31. Kemmler W., Peterson J. D., Steiner D. F.: *J. Biol. Chem.* 246, 6786 (1971).
32. Orci L., Ravazzola M., Amherdt M., Madsen O., Vassalli J. D., Perrelet A.: *Cell* 42, 671 (1985).
33. Steiner D. F., v knize: *Handbook of Experimental Pharmacology* (Cuatrecasas, P. and Jacobs, S., ed.). Springer-Verlag, Berlin 1990.
34. Rubenstein A. H., Steiner D. F.: *Annu. Rev. Med.* 22, 1 (1971).

35. Dodson E. J., Dodson G. G., Hubbard R. E., Reynolds C. D.: *Biopolymers* 22, 281 (1983).
36. Huml K., Klasová L., Barthová J.: *Chem. Listy* 96, 698 (2002).
37. Ullrich A., Shine J., Chirgwin J., Pictet R., Tischer E., Rutter W. J., Goodman H. M.: *Science* 196, 1313 (1977).
38. Bell G. I., Pictet R. L., Rutter W. J., Cordell B., Tischer E., Goodman H. M.: *Nature* 284, 26 (1980).
39. Soares M. B., Schon E., Henderson A., Karathanasis S. K., Cate R., Zeitlin S., Chirgwin J., Efstratiadis A.: *Mol. Cell Biol.* 5, 2090 (1985).
40. Owerbach D., Bell G. I., Rutter W. J., Brown J. A., Shows T. B.: *Diabetes* 30, 267 (1981).
41. Bell G. I., Gerhard D. S., Fong N. M., Sanchez-Pescador R., Rall L. B.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 82, 6450 (1985).
42. Bell G. I., Selby M. J., Rutter W. J.: *Nature* 295, 31 (1982).
43. Permutt M. A., Rotwein P., Andreone T., Ward W. K., Porte D., Jr.: *Diabetes* 34, 311 (1985).
44. Tager, H. S., v knize: *Handbook of Experimental Pharmacology* (Cuatrecasas P. and Jacobs S., ed.). Springer-Verlag, Berlin 1990.
45. Prentki M., Matschinsky F. M.: *Physiol. Rev.* 67, 1185 (1987).
46. Hedekov C. J.: *Physiol. Rev.* 60, 442 (1980).
47. Malaisse W. J.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 522, 284 (1988).
48. Malaisse W. J., Orci L.: *Methods Achiev. Exp. Pathol.* 9, 112 (1979).
49. Malaisse W. J., Garcia-Morales P., Dufrane S. P., Sener A., Valverde I.: *Endocrinology* 115, 2015 (1984).
50. Bartoš, V., Pelikánová, T., v knize: *Praktická diabetologie*. Maxdorf, Praha 2003.
51. Itoh N., Okamoto H.: *Nature* 283, 100 (1980).
52. Rabinovitch A., Blondel B., Murray T., Mintz D. H.: *J. Clin. Invest.* 66, 1065 (1980).
53. Mirsky I. A., Perisutti G.: *J. Biol. Chem.* 228, 77 (1957).
54. Duckworth, W. C., v knize: *Handbook of Experimental Pharmacology* (Cuatrecasas, P. and Jacobs, S., ed.). Springer-Verlag, Berlin 1990.
55. Burghen G. A., Kitabchi A. E., Brush J. S.: *Endocrinology* 91, 633 (1972).
56. Duckworth W. C., Heinemann M. A., Kitabchi A. E.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 69, 3698 (1972).
57. Ebrahim A., Hamel F. G., Bennett R. G., Duckworth W. C.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181, 1398 (1991).
58. Authier F., Posner B. I., Bergeron J. J.: *Clin. Invest. Med.* 19, 149 (1996).
59. Muller D., Baumeister H., Buck F., Richter D.: *Eur. J. Biochem.* 202, 285 (1991).
60. Roth R. A., Mesriow M. L., Yokono K., Baba S.: *Endocr. Res.* 10, 101 (1984).
61. Hamel F. G., Gehm B. D., Rosner M. R., Duckworth W. C.: *Biochim. Biophys. Acta* 1338, 207 (1997).
62. Duckworth W. C., Hamel F. G., Peavy D. E., Liepnies J. J., Ryan M. P., Hermodson M. A., Frank B. H.: *J. Biol. Chem.* 263, 1826 (1988).
63. Duckworth W. C.: *Endocr. Rev.* 9, 319 (1988).
64. Hamel F. G., Bennett R. G., Duckworth W. C.: *Endocrinology* 139, 4061 (1998).
65. Katzen H. M., Tietze F.: *J. Biol. Chem.* 241, 3561 (1966).
66. Bjelland S., Wallevik K., Kroll J., Dixon J. E., Morin J. E., Freedman R. B., Lambert N., Varandani P. T., Nafz M. A.: *Biochim. Biophys. Acta* 747, 197 (1983).
67. Assoian R. K., Tager H. S.: *J. Biol. Chem.* 257, 9078 (1982).
68. Freedman R. B.: *Cell* 57, 1069 (1989).
69. Rabkin R., Ryan M. P., Duckworth W. C.: *Diabetologia* 27, 351 (1984).
70. Jochen A., Hays J., Lee M.: *J. Cell Physiol.* 141, 527 (1989).
71. Stentz F. B., Harris H. L., Kitabchi A. E.: *Endocrinology* 116, 926 (1985).
72. Buffington C. K., El-Shiekh T., Kitabchi A. E., Matteri R.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 134, 412 (1986).
73. Duckworth W. C., Bennett R. G., Hamel F. G.: *Endocr. Rev.* 19, 608 (1998).
74. Terris S., Steiner D. F.: *J. Biol. Chem.* 250, 8389 (1975).
75. Seta K. A., Roth R. A.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 231, 167 (1997).
76. Levy J., Olefsky J. M.: *Endocrinology* 120, 450 (1987).
77. Backer J. M., Kahn C. R., Cahill D. A., Ullrich A., White M. F.: *J. Biol. Chem.* 265, 16450 (1990).
78. Hamel F. G., Posner B. I., Bergeron J. J., Frank B. H., Duckworth W. C.: *J. Biol. Chem.* 263, 6703 (1988).
79. Hamel F. G., Mahoney M. J., Duckworth W. C.: *Diabetes* 40, 436 (1991).
80. Authier F., Rachubinski R. A., Posner B. I., Bergeron J. J.: *J. Biol. Chem.* 269, 3010 (1994).
81. Seabright P. J., Smith G. D.: *Biochem. J.* 320, 947 (1996).
82. Authier F., Danielsen G. M., Kouach M., Briand G., Chauvet G.: *Endocrinology* 142, 276 (2001).
83. Authier F., Metioui M., Fabrega S., Kouach M., Briand G.: *J. Biol. Chem.* 277, 9437 (2002).
84. Duckworth W. C., Garcia J. V., Liepnies J. J., Hamel F. G., Hermodson M. A., Frank B. H., Rosner M. R.: *Biochemistry* 28, 2471 (1989).
85. Dodson G. G., Dodson E. J., Turkenburg J. P., Bing X.: *Biochem. Soc. Trans.* 21, 609 (1993).

L. Žáková and J. Jiráček (*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*): **Biosynthesis, Secretion and Degradation of Insulin**

Insulin was isolated and used as a therapeutic agent for the first time more than 80 years ago. In subsequent decades, the structure of insulin was fully resolved and several insulin analogues were introduced in clinical prac-

tice. Important discoveries were made concerning the mechanism of action of insulin, its interaction with receptors, and insulin-dependent cellular processes. Despite all these successes, diabetes mellitus remains one of the most important human diseases with high morbidity and mortality. Therefore, studies of insulin secretion, regulation of its expression, and mechanism of action still remain important topics. The review summarizes the latest knowledge in the field.

BIOCHEMICKÉ A TOXIKOLOGICKÉ ASPEKTY ETIOLOGIE BALKÁNSKÉ ENDEMICKÉ NEFROPATIE

MARIE STIBOROVÁ^a, JIŘÍ PATOČKA^b,
EVA FREI^c a HEINZ H. SCHMIESER^c

^a Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Albertov 2030, 128 40 Praha 2, ^b Katedra toxikologie, Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany, Hradec Králové a katedra radiologie a toxikologie, Zdravotně sociální fakulta, Jihočeská univerzita, České Budějovice, ^c Division of Molecular Toxicology, German Cancer Research Center, Im Neuenheimer Feld 280, 69120 Heidelberg, Germany
stiborov@natur.cuni.cz

Došlo 10.3.05, přijato 23.6.05.

Klíčová slova: nefropatie, nádory močových cest, etiologie, mykotoxiny, ochratoxin A, aristolochové kyseliny, aromatické aminy, těžké kovy, genetické faktory, enzymy

Obsah

1. Úvod
2. Hypotézy etiologie balkánské endemické nefropatie
 - 2.1. Polycyklické aromatické uhlovodíky a aromatické aminy
 - 2.2. Těžké kovy
 - 2.3. Mykotoxiny
 - 2.4. Aristolochové kyseliny
 - 2.5. Genetické faktory
3. Závěr

1. Úvod

Balkánská endemická familiární nefropatie je choroba rozšířená v geograficky limitovaných oblastech, v populaci žijící v oblasti podél řeky Dunaje (do vzdálenosti až 100 km od toku) v některých částech Bulharska, Rumunska a zemí bývalé Jugoslaviie^{1–3}. Uvedené onemocnění je charakterizované pomalu postupujícím progresivním zánětem intersticia ledviny, který vede až k totálnímu selhání funkce tohoto orgánu. Proces je ireversibilní a končí zpravidla terapií formou dialýzy, event. následnou transplantací postiženého orgánu^{1–4}. Klinicky a morfologicky je balkánská endemická nefropatie charakterizována signifikantními změnami struktur ledvinných tubulů, intesticiální fibrosou a postupným poškozením renálního parenchymu vedoucímu k totální atrofii orgánu. Je provázána anemií, ztrátou tělesné hmotnosti a bolestmi hlavy, u pacientů však

absentuje hypertenze typická pro jiné nefropatie¹. Z charakteristických biochemických změn je nutné zmínit proteinurii, glukosurii, zvýšený obsah kreatininu v seru, zvýšení hladin některých enzymů (γ -glutamyltransferasy, alkalické fosfatasy, laktátdehydrogenasy), plasmatických imunoglobulinů IgM a IgG a pH moči^{3,5}. Choroba je spojena s multifokálními, pomalu rostoucími, povrchovými, „low-grade“ tumory pánvičky ledvin a s tvorbou tumorů i dalších částí močového traktu^{1–4}.

Mezi dosud nevyřešené otázky spojené s balkánskou endemickou nefropatií patří poznání příčin choroby, a to i přesto, že úloha řady potenciálních faktorů (především faktorů genetických a enviromentálních) byla již studována^{3,6}. Epidemiologické a genetické studie napovídají pro multifaktoriální původ balkánské endemické nefropatie. V současnosti bylo vysloveno několik hypotéz, které se pokoušejí vysvětlit původ jak tohoto ledvinného onemocnění, tak i tumorů močového traktu, které chorobu provázejí.

2. Hypotézy etiologie balkánské endemické nefropatie

2.1. Polycyklické aromatické uhlovodíky a aromatické aminy

Za jednu z příčin balkánské nefropatie je považováno dlouhodobé vystavení obyvatelstva postižené oblasti polycyklickým aromatickým uhlovodíkům a aromatickým aminům, které se dostávají do životního prostředí v postižených regionech z ložisek lignitu a uhlí⁷. Výskyt takových organických sloučenin byl prokázán již v polovině 70. let, detegovány byly jako složky olejových skvrn ve vodách jezer a řek endemických oblastí s výskytem balkánské nefropatie. Jejich přítomnost byla prokázána i v pitné vodě konzumované obyvatelstvem regionů postižených balkánskou nefropatií⁷. Skutečnost, že aromatické aminy vykazují nefrotoxické a karcinogenní účinky, rovněž jako jejich efektivita vyvolávat tvorbu nádorů močových cest, je známa již řadu let, jak ze studií experimentálních, tak i epidemiologických^{8,9}. Metabolickou aktivací obou typů aromatických sloučenin vznikají reaktivní intermediáty (diolepoxidy resultující v tvorbu karbeniových iontů z polycyklických aromatických uhlovodíků a nitreniové či karbeniové ionty z aromatických aminů), které kovalentně modifikují DNA cílových orgánů (tvorba DNA aduktů). Tím pak iniciují patologické procesy^{9,10}. Adukty aktivovaných toxikantů s DNA mohou být prokazatelně detegovány řadou experimentálních metod^{11–14} a korelovány s vývojem choroby. Studie sledující tvorbu takových aduktů v DNA pacientů z oblastí postižených balkánskou endemickou nefropatií však dosud chybí.

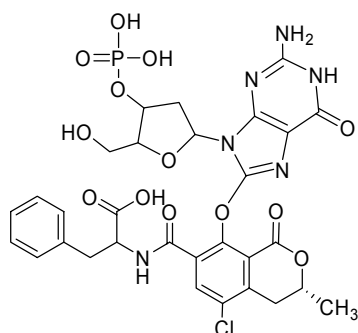
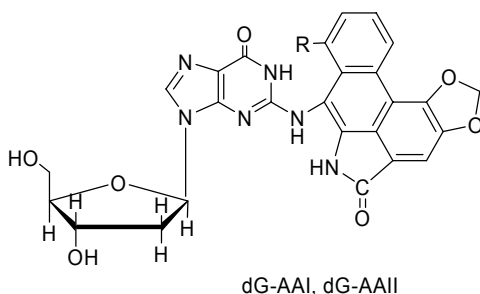
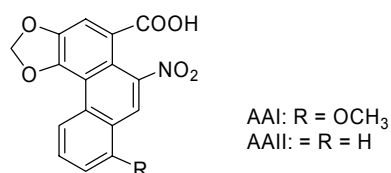
2.2. Těžké kovy

Nichifor a spol.¹⁵ prokázali, že se v endemických oblastech s výskytem balkánské nefropatie nacházejí v okolí vodních zdrojů vysoké koncentrace kadmia, chromu, hořčíku, kobaltu, niklu a mědi a jejich iontů. Zvýšený obsah některých iontů těchto kovů (Mg, Cu, Ni) byl navíc detegován v moči pacientů trpících uvedenou chorobou³. Vzhledem k nefrotoxicitě uvedených kovů jsou proto také považovány za jednu z příčin, působící pravděpodobně v kombinaci s dalšími faktory, a participující na vývoji choroby^{16–19}. Těžké kovy totiž způsobují vážné poškození ledvinového tubulárního systému a nalezeny byly i některé morfologické podobnosti mezi nefropatií vyvolanou těžkými kovy a balkánskou endemickou nefropatií³. Biochemický mechanismus působení těžkých kovů zahrnuje poškození membrán renálních buněk (kalciový kanál), iniciaci oxidativního stresu a produkci superoxidových aniontů, nárůst peroxidace lipidů a poškození biologické funkce SH proteinů (vazba iontů těžkých kovů na SH skupiny esenciální pro jejich působení).

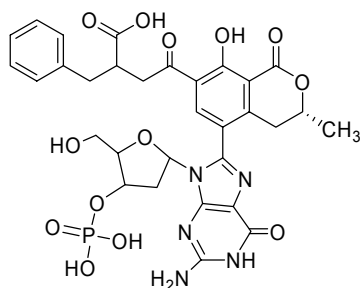
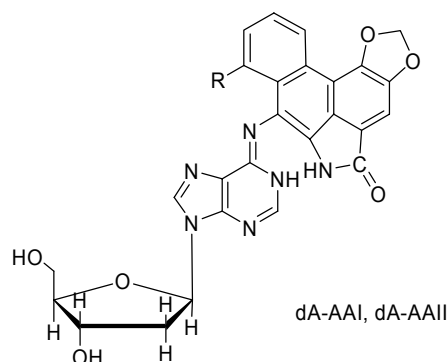
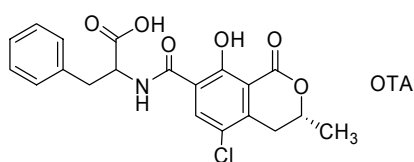
2.3. Mykotoxiny

Další hypotéza předpokládá původ choroby v působení mykotoxinů. Vychází z premisy, že choroba může být způsobena intoxikací obyvatelstva postižené oblasti dlouhodobým opakovaným příjmem malých dávek nefrotoxického a karcinogenního mykotoxinu ochratoxinu A (obr. 1), event. dalšího mykotoxinu citrininu^{3,20}.

Hypotéza považující ochratoxin A za původce balkánské nefropatie a následného vývoje tumorů močového traktu vychází z několika skutečností. Prvou z nich je nápadná podobnost mezi strukturálními změnami v ledvinách i změnami jejich funkce vyvolanými v experimentálních zvířatech ochratoxinem A a klinickými i patologickými příznaky balkánské nefropatie³. Nefropatie vyvolaná ochratoxinem A je např. rovněž provázána intersticiální fibrosou, atrofií tubulů, patologickými změnami v glomerulech, a dalšími procesy, které jsou obdobné s příznaky provázejícími balkánskou endemickou nefropatií. Ochratoxin A je navíc mykotoxinem vykazujícím nejen nefrotoxické účinky, ale je rovněž karcinogenem generující



O-C8 OTA-3'-dGMP



C-C8 OTA-3'-dGMP

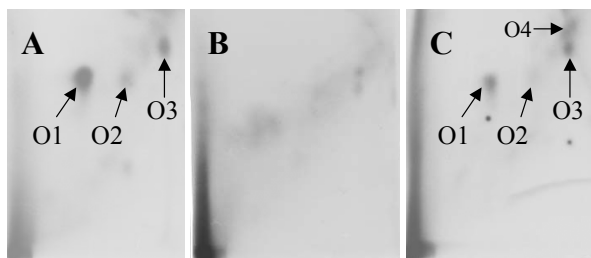
Obr. 1. Struktura ochratoxinu A (OTA), aristolochových kyselin (AA) a jejich aduktů s DNA

cím tumory močového traktu³.

Další skutečností podporující původ balkánské nefropatie působením ochratoxinu A je zjištění, že v potravinách, které byly konzumovány postiženými skupinami obyvatelstva v ovlivněných oblastech byly nalezeny vyšší koncentrace ochratoxinu A než v potravinách z jiných oblastí. Detailně byl sledován obsah ochratoxinu A v kukuřici a fazoli jako převládajících rostlinných složek potravin konzumovaných obyvatelstvem postižených oblastí³. V letech 1981–1991, kdy byly tyto produkty analyzovány, byl obsah ochratoxinu A v rostlinných složkách potravin vyšší než 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ přítomen ve více než 50 % analyzovaných vzorků z postižených oblastí. Naproti tomu byl takový obsah v uvedených produktech z nepostižených oblastí, nicméně geograficky lokalizovaných v jejich blízkosti, detegován pouze asi v 10 % analyzovaných vzorků³. Ochratoxin A byl rovněž detegován v masných produktech distribuovaných v postižených oblastech a konzumovaných obyvatelstvem, detailní analýza takových výrobků z různých oblastí však dosud nebyla realizována³.

Hypotéza, že ochratoxin A participuje na etiologii onemocnění, vychází rovněž z nálezu, že v krvi obyvatelstva oblasti postižené balkánskou nefropatií byly zjištěny vyšší koncentrace ochratoxinu A než v krvi obyvatelstva žijícího v oblastech neovlivněných^{3,20,21}. Obsah tohoto mykotoxinu v krvi dosahuje koncentrací 5–50 ng ml^{-1} krve u více než 2 % obyvatelstva postižených oblastí³. Pro srovnání lze uvést koncentrace ochratoxinu A nalezené v krvi obyvatel České republiky. Malíř a spol. vyšetřili 2206 vzorků lidského séra a ochratoxin A našli v 2077 případech (94 %) v průměrné koncentraci 0,28 ng ml^{-1} (cit.²¹).

Zásadním nálezem podporujícím původ choroby v ochratoxinu A je skutečnost, že v DNA tumorů močových cest několika jedinců žijících v postižené oblasti byly nalezeny adukty, které jeví podobnost s adukty nalezenými v DNA experimentálních zvířat vystavených ochratoxinu A^{3,20,22}. K detekci a identifikaci aduktů tvořených z ochratoxinu A byla využita vysoce sensitivní Randerathova metoda (³²P-postlabeling)^{11–14}. Takové adukty byly prokázány i naší laboratoří, analýzou vzorků DNA ledvin pacientů trpících tumory močových cest z balkánské endemické oblasti (adukty O1–O4 v DNA uvedené v obr. 2)²³. Výsledky experimentů sledujících generaci aduktů z ochratoxinu A v DNA *in vitro* a *in vivo* jsou však

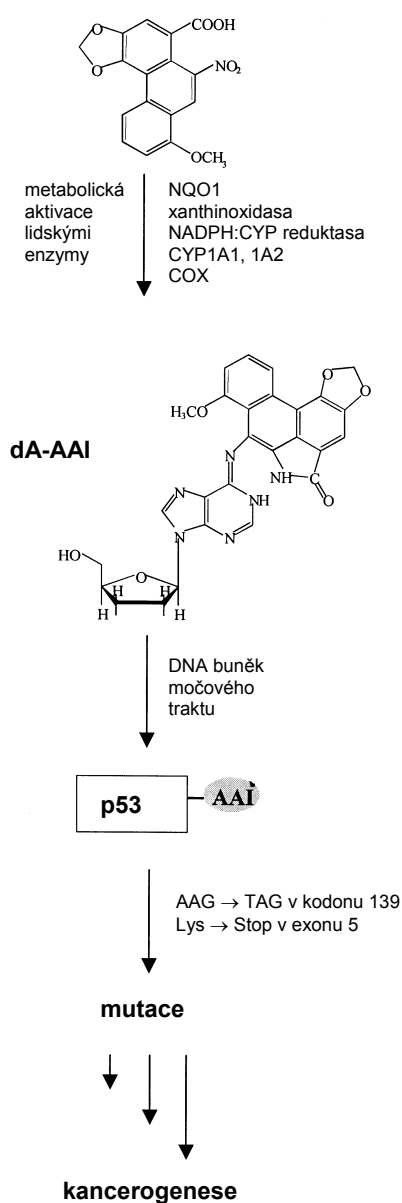


Obr. 2. Adukty derivované z ochratoxinu A v DNA ledvin pacientů z oblastí balkánské endemické nefropatie (Slavonski Brod)²³

v několika laboratořích kontroverzní. Ačkoliv v řadě prací byly adukty odvozené od ochratoxinu A prokazatelně detegovatelné^{3,20,22–25}, v jedné z detailních recentních studií však nalezeny nebyly²⁶. Kontroverzní jsou také výsledky a názory na to, zda je ochratoxin A genotoxickým či epigenetickým karcinogenem^{3,24,26–32}. Jinými slovy řečeno, zda jsou adukty nalezené v DNA tvořeny přímo z reaktivních metabolitů ochratoxinu A nebo zda pochází ze sekundárních vlivů provázejících jeho metabolismus (např. aktivních forem kyslíku, které mohou poškozovat DNA). Ochratoxin A je v organismech metabolizován cytochromy P450 na hydroxylované deriváty, 4(R)- a 4(S)-hydroxyochratoxin A, je však substrátem, který je těmito enzymy oxidován velmi obtížně. Navíc tyto metabolity nejsou zodpovědné za jeho genotoxicitu³². Naproti tomu bylo nedávno prokázáno, že peroxidasy generují z ochratoxinu A primárně fenoxylový radikál, dále pak hydrochinon a chinon tohoto mykotoxinu. Radikál ochratoxinu A pak reaguje s nukleofilními centry nukleových kyselin^{24,28–30}. Poslední výsledky laboratoře Pfohl-Leskowicz a Castegnara nedávno skutečně jasně prokázaly nejen tvorbu aduktů generovaných v DNA ledvin potkana a prasete působením ochratoxinu A, určily však i strukturu dvou majoritních aduktů (C-C8-dG a O-C8-dG adukty)³³ (obr. 1). To vše mluví pro genotoxický mechanismus toxického a karcinogenního působení ochratoxinu A. Pro plné potvrzení jak genotoxického mechanismu působení ochratoxinu A, tak i jeho úlohy v etiologii balkánské endemické nefropatie je však nutné prokázat tvorbu aduktů v DNA ještě v následných detailních studiích s experimentálními zvířaty, rovněž jako u dalších pacientů trpících touto chorobou.

2.4. Aristolochové kyseliny

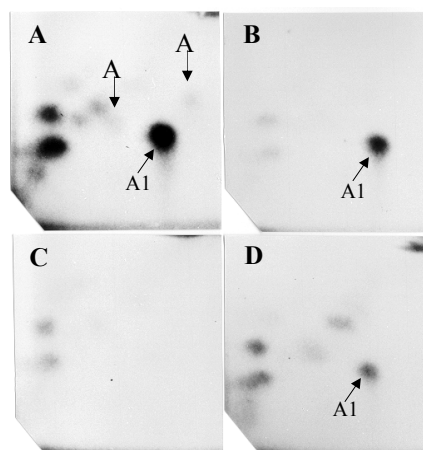
Další hypotéza přičítá původ vývoje choroby působení látek rostlinného původu, jmenovitě dvou nitrofenantrenových sloučenin, aristolochových kyselin (obr. 1). Tento předpoklad vychází z překvapující podobnosti mezi balkánskou nefropatií a progresivní renální intersticiální fibrosou spojenou s vývojem tumorů močových cest, nedávno nově popsáným ledvinovým onemocněním označovaným jako „Chinese herbs nephropathy“ (CHN)^{34,35}. Za důvod uvedených ledvinových poruch byl nedávno jednoznačně určen příjem nefrotoxických a karcinogenních aristolochových kyselin, které byly součástí rostlinné diety pacientů trpících touto chorobou^{25,36–42}. Vzhledem k jednoznačnosti původu tohoto ledvinového a nádorového onemocnění v konzumaci aristolochových kyselin (především aristolochové kyseliny I, která je majoritním podílem AA rostlinných součástí), je nyní označována jako nefropatie vyvolaná aristolochovými kyselinami (Aristolochic Acid Nephropathy, AAN)^{40,41}. Hypotézu, že aristolochové kyseliny mohou participovat na vývoji balkánské endemické nefropatie, navíc podporují skutečnosti, že rostlinné extrakty obsahující aristolochové kyseliny jsou již od nepaměti užívány v lidovém léčitelství v postižených oblastech a části rostlin čeledi *Aristolochiaceae* byly nalezeny v sýpkách, ve kterých jsou skladovány obiloviny^{43–45}. Není bez zajímavosti, že za původce balkánské



Obr. 3. Schéma iniciace nádorových procesů vyvolaných aristolochovou kyselinou I v lidském organismu; NQO1, NAD(P)H:chinonoxidoreduktasa; CYP, cytochrom P450; COX, cyklooxygenasa (prostaglandin H synthasa)

nefropatie byly aristolochové kyseliny označeny již v roce 1970 (cit.⁴⁶), tedy v době, kdy onemocnění vyvolané těmito přírodními látkami ještě nebylo popsáno.

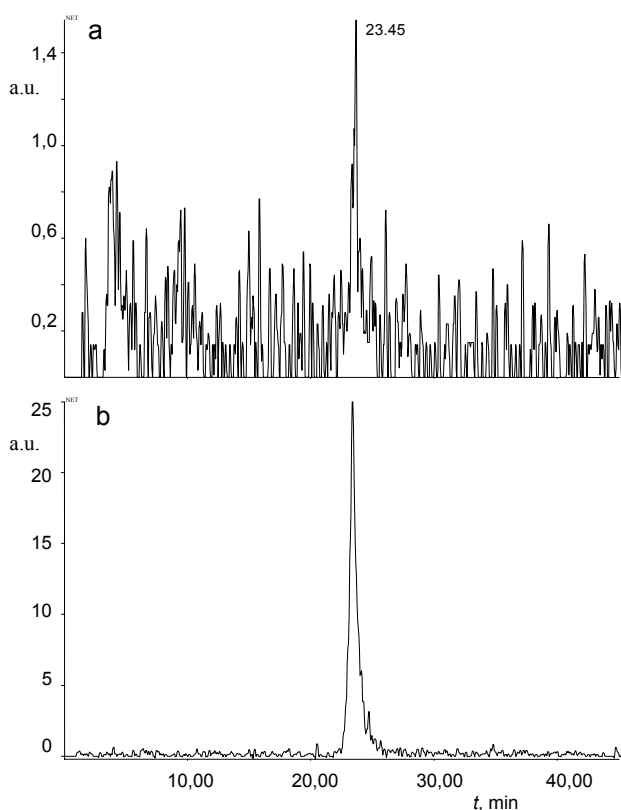
Metabolické studie prokázaly, že majoritními metabolity aristolochových kyselin tvořenými *in vitro* a *in vivo* jsou redukční produkty aristolaktamy, jež byly detegovány jak v konjugované, tak i nekonjugované formě v moči a výkalech saveců včetně člověka^{40,47}. Aktivace aristolochových kyselin na reaktivní metabolity iniciující toxické a karcinogenní účinky probíhá rovněž redukční cestou^{14–16}.



Obr. 4. Aduktů nalezené v DNA ledvin pacientů trpících nefropatií vyvolanou aristolochovými kyselinami (A) a adukty v DNA ledvin pacientů z oblasti balkánské endemické nefropatie (vzorky analyzované též z hlediska aduktů generovaných z ochratoxinu A, viz obr. 2) (B-D); adukt A1 reprezentuje adukt dA-AAI, A2, dG-AAI a A3, dA-AAII

V průběhu redukce obou kyselin dochází ke vzniku reaktivního cyklického acylnitreniového iontu, který se váže na DNA a tvoří dva majoritní adukty jak v experimentech *in vitro*, tak i u experimentálních zvířat *in vivo*, rovněž jako v DNA ledvin a močové trubice pacientů trpících chorobou AAN (cit.^{30,42,48–54}). Jde o adukty s deoxyadenosinem a deoxyguanosinem [7-(deoxyadenosin-N⁶-yl)-aristolaktam (dA-AA) a 7-(deoxyguanosin-N²-yl)-aristolaktam (dG-AA)] (obr. 1, 3 a 4). K detekci a identifikaci aduktů tvořených z aristolochových kyselin byla rovněž využita metoda ³²P-postlabeling^{30,42,48–54}. Jejím prostřednictvím byl odhalen i vztah mezi perzistencí aduktů a karcinogenním účinkem aristolochových kyselin. Na rozdíl od doby přetrvání aduktu 7-(deoxyguanosin-N²-yl)-aristolaktamu I v DNA různých orgánů experimentálních zvířat (potkanů), která nebyla delší než dva týdny, persistence aduktů s deoxyadenosinem (dA-AAI) byla dlouhodobá³⁷. Dlouhodobá persistence deoxyadenosinového aduktu je tak kritickým prekarcinogenním stavem (lézí v DNA), který je zodpovědný za iniciaci karcinogeneze vyvolané aristolochovou kyselinou. Tento adukt byl skutečně nalezen jako persistentní léze způsobující mutaci tumor supresorového genu p53 [mutace AAG → TAG v kodonu 139 (Lys → Stop) v exonu 5] pacientů trpících chorobou⁴². Schéma molekulárního mechanismu karcinogeneze vyvolané aristolochovou kyselinou v lidském organismu je uvedené na obr. 3.

Výsledky získané mezinárodním týmem složeným z pracovníků laboratoří katedry biochemie PrF UK a pracovišť ze SRN, Belgie, Francie a Chorvatska, plně podporují předpoklad, že aristolochové kyseliny mohou být jednou z příčin balkánské endemické nefropatie²³. V DNA vzorků ledvin několika jedinců žijících v oblasti postižené balkánskou nefropatií a vykazujících příznaky této choroby byly nalezeny prekarcinogenní léze v DNA,



Obr. 5. HPLC aduktu A1 panelu B obrázku 3 (A) a standardu aduktu dA-AAI (B); experimentální podmínky pro separaci aduktů jsou detailně popsány v citacích^{36–38,50–55}

konkrétně adukt dA-AAI (obr. 4 a 5). Vzhledem k tomu, že se jedná o tytéž vzorky ledvin, v jejichž DNA byly nalezeny i adukty generované ochratoxinem A (obr. 2), v poškození DNA ledvin pacientů testovaných v uvedené studii je tedy rovněž nutné brát v úvahu i úlohu tohoto mykotoxinu.

Z analýz DNA z vzorků ledvin těchto pacientů i pacientů trpících nefropatií vyvolanou aristolochovými kyselinami^{36–39} navíc vyplývá, že jejich DNA nebyla ovlivněna působením polycyklických aromatických uhlovodíků a aromatických aminů. Absence silně hydrofobních aduktů generovaných těmito látkami, lokalizovanými především v diagonální zóně autoradiografických snímků^{9,14}, je toho velmi podstatným důkazem (obr. 2 a 4). Participace těchto sloučenin na vývoji obou ledvinových chorob a následného vývoje nádorů močových cest všech těchto pacientů je tedy pravděpodobně minimální, či chybí vůbec.

2.5. Genetické faktory

Další hypotéza pokládá za nejpodstatnější faktory podmiňující vývoj balkánské nefropatie faktory genetické⁵⁶. Stěžejní význam pro vznik a vývoj této choroby mají pravděpodobně geny lokalizované v oblasti mezi geny 3q25 a 3q26 (cit.⁶). V této oblasti je lokalizováno mnoho genů

kódujících značně rozdílné proteiny (např. kalcium-senzitivní receptor, podjednotky kalciového kanálu, člena rodiny *ras* oncogenů RAP2B, iniciační faktor proteosynthesy IF2A, fosfatasu proteinů 1, receptory spojené s G proteinem, methyltransferasu). Které z genů se k vývoji balkánské endemické nefropatie přímo vztahují, však dosud známo není⁶. Z jiných genetických faktorů participujících na vyvolání balkánské nefropatie může být uvažována i genetická heterogenita (genetický polymorfismus) enzymů metabolizujících xenobiotika, popř. geneticky podmíněné defekty imunitního systému⁵⁷. Vztah mezi genetickým polymorfismem enzymů metabolizujících xenobiotika, konkrétně těch, které jsou považovány za potenciální příčiny choroby (ochratoxin A, aristolochové kyseliny, aromatické aminy), a vlastním onemocněním dosud nebyl zkoumán. Je však známo, že polymorfismus některých enzymů metabolizujících (aktivujících a detoxikujících) tyto a další karcinogeny [např. cytochromů P450 1A1/2, NAD(P)H:chinonoxidoreduktasy, receptoru kontrolující jejich expresi (Ah receptoru), cytochromů P450 podrodiny 2C, myeloperoksidasy]^{3,24,30,33,36,38,40,51–55} patří mezi faktory, které ovlivňují vývoj řady nádorových onemocnění⁵⁷.

3. Závěr

Otevřenými otázkami zůstává, jak jednotlivé výše uvedené příčiny, dosud více méně stále ještě hypotetické, na původu balkánské nefropatie skutečně participují a jakou měrou. Záměrem projektu podporovaném Grantovou agenturou Univerzity Karlovy (GAUK 432/2004) je proto na tyto otázky odpovědět. Vysvětlení etiologie balkánské endemické nefropatie je vysoce aktuální. Vyřešením této problematiky lze předpokládat získání podstatných poznatků zásadních pro rozvoj základního výzkumu v oblasti poznání procesů, které jsou limitující pro patologické procesy vedoucí k poškození ledvin i následnou tvorbu nádorů, rovněž jako v oblasti studia enzymových systémů participujících na iniciační fázi těchto procesů. Vyřešení původu balkánské nefropatie má však také velký praktický význam, neboť může být využito k terapeutickému zásahu a přispět tak k lepší prognóze vývoje choroby. Navíc může napomoci i v předvídání rizik a prevenci nejen této choroby, ale dalších onemocnění vyvolaných environmentálními a genetickými faktory.

Podporováno Grantovou agenturou Univerzity Karlovy (grant GAUK 432/2004) a MŠMT ČR (grant MSM0021620808).

LITERATURA

1. World Health Organisation: *Memorandum: The Endemic Nephropathy of South-Eastern Europe* Geneva: WHO, str. 431, 1965.
2. Ikonov V., Melzer H., Neonov V., Stoicheva A.,

- Stiller S., Mann H.: *Artif. Organs* 23, 75 (1999).
3. Pfohl-Leszkowicz A., Petkova-Bocharova T., Chernozemsky I. N., Castegnaro M.: *Food Additiv. Contamin.* 19, 282 (2002).
4. Castegnaro M., Chernozemsky I. N., Hietanen E., Bartsch H.: *Arch. Geschwulstforsch.* 60, 295 (1990).
5. Stefanovic V., Polenakovic M. H.: *Am. J. Nephrol.* 11, 1 (1991).
6. Stefanovic V.: *Q. J. Med.* 91, 457 (1998).
7. Tatu C. A., Orem W. H., Finkelman R. B., Feder G. L.: *Environ. Health Perspect.* 106, 689 (1998).
8. Johansson S. L., Cohen S. M.: *Semin. Surg. Oncol.* 13, 291 (1997).
9. Kadlubar F. F.: *IARC Sci. Publ.* 125, 199 (1994).
10. Guengerich P. F.: *Chem. Res. Toxicol.* 4, 391 (1991).
11. Phillips D. H.: *Mutat. Res.* 378, 1 (1997).
12. Phillips D. H., Castegnaro M.: *Mutagenesis* 14, 301 (1999).
13. Stiborová M., Frei E., Bieler C. A., Schmeiser H. H.: *Chem. Listy* 92, 661 (1998).
14. Stiborová M., Rupertová M., Hodek P., Frei E., Schmeiser H. H.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 69, 477 (2004).
15. Nichifor E., Balba M., Rusu G., Melencu M., Chirdanescu N., Cristescu I., Dovalate C., Sonoc S.: *Médecine Interne* 23, 229 (1985).
16. Markovic B., Lebedev S., Djordjevic M., Arambasic M.: *Médecine Biol. Environ.* 1, 1 (1976).
17. Markovic B.: *J. d'Urol. (Paris)* 94, 53 (1988).
18. Markovic B.: *J. d'Urol. (Paris)* 96, 31 (1990).
19. Radovanovic Z., Markovic-Denic L., Marinkovic J., Jevremovic I., Jankovic S.: *Nephron* 57, 52 (1991).
20. Pfohl-Leszkowicz A., Grosse Y., Castegnaro M., Nicolov I. G., Chernozemsky I. N., Bartsch H., Betbeder A. M., Creppy E. E., Dirheimer G.: *IARC Sci. Publ.* 124, 141 (1993).
21. Malíř F., Ostrý V., Černá M., Kačerovský J., Roubal T., Škarková J., Brndiar M., Fixa P.: *Čas. Lék. Česk.* 143, 691 (2004).
22. Grosse Y., Baudrimont I., Castegnaro M., Betbeder A. M., Creppy E. E., Dirheimer G., Pfohl-Leszkowicz A.: *Chem.-Biol. Interact.* 95, 175 (1995).
23. Arlt V., Ferluga D., Stiborová M., Pfohl-Leszkowicz A., Vukelic M., Ceovic S., Schmeiser H. H., Cosyns J.-P.: *Int. J. Cancer* 101, 500 (2002).
24. Obrecht-Pflumio S., Dirheimer G.: *Chem.-Biol. Interact.* 127, 29 (2000).
25. Arlt V. M., Pfohl-Leszkowicz A., Cosyns J.-P., Schmeiser H. H.: *Mutat. Res.* 494, 143 (2001).
26. Mally A., Zepnik H., Wanek P., Eder E., Dingley K., Ihmels H., Volkel W., Dekant W.: *Chem. Res. Toxicol.* 17, 234 (2004).
27. Zepnik H., Pahler A., Schauer U., Dekant W.: *Toxicol. Sci.* 59, 59 (2001).
28. Dai J., Wright M. W., Manderville R. A.: *J. Am. Chem. Soc.* 125, 3716 (2003).
29. Dai J., Wright M. W., Manderville R. A.: *Chem. Res. Toxicol.* 16, 817 (2003).
30. Obrecht-Pflumio S., Dirheimer G.: *Arch. Toxicol.* 75, 583 (2001).
31. El-Aldouni C., Pinelli E., Azenar B., Zaoui D., Beaune P., Pfohl-Leszkowicz A.: *Environ. Molec. Mutagenesis* 35, 123 (2000).
32. Gautier J.-C., Richoz J., Welti D. H., Markovic J., Grenaud E., Guengerich F. P., Turesky R. J.: *Chem. Res. Toxicol.* 14, 34 (2001).
33. Faucet V., Pfohl-Leszkowicz A., Dai J., Castegnaro M., Manderville R. A.: *Chem. Res. Toxicol.* 17, 1289 (2004).
34. Vanverheagen J.-L., Depierreux M., Tielemans C., Abramowicz D., Dratwa M., Jadoul M., Richard C., Vandervelde D., Verbeelen D., Vanhaelen-Fastre R., Vanhaelen M.: *Lancet* 341, 387 (1993).
35. Cosyns J. P., Jadoul M., Squifflet J. P., De-Plaen J. F., Ferluga D., van Ypersele de Strihou C.: *Kidney Int.* 45, 1680 (1994).
36. Schmeiser H. H., Bieler C. A., Wiessler M., van Ypersele de Strihou C., Cosyns J.-P.: *Cancer Res.* 56, 2025 (1996).
37. Bieler C. A., Stiborová M., Wiessler M., Cosyns J.-P., van Ypersele de Strihou C., Schmeiser H. H.: *Carcinogenesis* 18, 1063 (1997).
38. Stiborová M., Frei E., Breuer A., Bieler C. A., Schmeiser H. H.: *Exp. Toxic. Pathol.* 51, 421 (1999).
39. Nortier J. L., Muniz Martinez M. C., Schmeiser H. H., Arlt V. M., Bieler C. A., Petein M., Depierreux M. F., De Pauw L., Abramowicz D., Vereerstraeten P., Vanherweghen J. L.: *New Engl. J. Med.* 342, 1686 (2000).
40. Arlt V., Stiborová M., Schmeiser H. H.: *Mutagenesis* 17, 265 (2002).
41. Cosyns J. P.: *Drug Safety* 26, 33 (2003).
42. Lord G. M., Hollstein M., Arlt V. M., Roufosse C., Pusey C. D., Cook T., Schmeiser H. H.: *Am. J. Kidney Dis.* 43, Art.No.e11 (2004).
43. Rucker G., Chung B. S.: *Planta Medica* 27, 68 (1975).
44. Harwell J. C.: *Plants Used Against Cancer*. Quaternary Publications, Lawrence 1982.
45. Hranjec T., Kovac A., Kos J., Mao W. Y., Chen J. J., Grollman A. P., Jelakovic B.: *Croat. Med. J.* 46, 116 (2005).
46. Ivic M.: *Acta Fac. Med. Naiss.* 1, 29 (1970).
47. Krumbiegel G., Hallensleben J., Meunicke W., Rittman N., Roth M. J.: *Xenobiotica* 17, 981 (1987).
48. Pfau W., Schmeiser H. H., Wiessler M.: *Carcinogenesis* 11, 313 (1990).
49. Pfau W., Schmeiser H. H., Wiessler M.: *Chem. Res. Toxicol.* 4, 581 (1991).
50. Stiborová M., Fernando R. C., Schmeiser H. H., Frei E., Pfau W., Wiessler M.: *Carcinogenesis* 15, 1187 (1994).
51. Schmeiser H. H., Frei E., Wiessler M., Stiborová M.: *Carcinogenesis* 18, 1055 (1997).
52. Stiborová M., Frei E., Wiessler M., Schmeiser H. H.: *Chem. Res. Toxicol.* 14, 1128 (2001).
53. Stiborová M., Frei E., Sopko B., Wiessler M.,

- Schmeiser H. H.: *Carcinogenesis* 23, 617 (2002).
54. Stiborová M., Frei E., Sopko B., Sopková K., Marková V., Laňková M., Kumstýřová T., Wiessler M., Schmeiser H. H.: *Carcinogenesis* 24, 1695 (2003).
55. Stiborová M., Frei E., Hodek P., Wiessler M., Schmeiser H. H.: *Int. J. Cancer* 113, 189 (2005).
56. Toncheva D., Dimitrov T., Stoyanova S.: *Eur. J. Epidemiol.* 14, 389 (1998).
57. Smith G., Stanley L. A., Sim E., Strange R. C., Wolf C. R.: *Cancer Surv.* 25, 27 (1995).

M. Stiborová^a, J. Patočka^b, E. Frei^c, and H. H. Schmeiser^c (^a*Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague,* ^b*Department of Toxicology, Faculty of Military Health Service, University of Defence, Hradec Králové, Czech Republic,* ^c*Division of Molecular Toxicology, German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany*): **Biochemistry and Toxicological Aspects of Etiology of Balkan Endemic Nephropathy**

Balkan endemic nephropathy is a unique renal fibrosis leading to progressive and gradually developing renal failure, followed by development of tumors of the urinary tract. Several hypotheses concerning the etiology of this disease have been investigated, including environmental factors (heavy metals, polycyclic aromatic hydrocarbons, aromatic amines, fungal and plant toxins) and/or genetic factors. The article reviews the different hypotheses and pays particular attention to the biochemical role of the mycotoxin ochratoxin A and the plant product aristolochic acid.

PŘÍRODNÍ BAREVNÉ LÁTKY

JANA ČOPÍKOVÁ^a, MICHAL UHER^b,
OLDŘICH LAPČÍK^c, JITKA MORAVCOVÁ^c
a PAVEL DRAŠAR^{c,d}

^a Ústav chemie a technologie sacharidů, FPBT, VŠCHT, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^b Fakulta chemické a potravinářské technologie, STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, ^c Ústav chemie přírodních látek, FPBT, VŠCHT, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^d Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo 2, 166 10 Praha 6

Došlo 8.8.05, přijato 30.9.05.

Klíčová slova: přírodní barvivo, pigment, potravní doplněk, obnovitelné zdroje

Obsah

1. Úvod
 - 1.1. Přírodní barviva živočišná
 - 1.2. Přírodní barviva rostlinná
 - 1.3. Přírodní barviva minerální
2. Polyenová barviva
3. Chinonová barviva
4. Indolová barviva
5. Pyranová barviva
6. Oligopyrrollová barviva
7. Pteridinová barviva
8. Isochinolinová barviva
9. Ostatní barviva
10. Přehled potravinářských „éček“
11. Závěr

1. Úvod

Obecně můžeme barevné substance rozdělit na barviva, která obvykle bývají zpracovatelná ve formě pravého či nepravého roztoku a dělí se proto často dále na barviva rozpustná ve vodě, rozpustná v organických rozpouštědlech, barviva disperzní, kypová, atd., a na pigmenty (obvykle nerozpustné, používané např. v suspenzi), a pod. V češtině je pojem barvivo poněkud širší než např. v angličtině (dye/ colorant), neboť často jsou termíny např. barvivo, barevná látka, pigment, zaměňovány.

Barevné látky absorbují část viditelného spektra elektromagnetického záření v rozsahu 380–780 nm. Pro použí-

tí látky jako barvivo či pigment je důležité, aby látka měla i dostatečně vysoký absorpční koeficient ($10\,000$ až $40\,000\text{ l mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$), aby byla dostatečně stálá (proti změnám fotochemickým, chemickým, k oxidaci, atd.) a v neposlední řadě, aby nebyla toxická.

Přírodní barviva jsou předmětem řady studií^{1–4}, nicméně, málokdo se zabývá chemismem těchto látek⁵. Samozřejmě, že se téměř v každé učebnici můžeme seznámit s principy barevnosti a spektroskopie. Zajímavé jsou internetové portály, kde se můžeme dozvědět často mnohem více^{6–11}. O barvičkách to pak platí ve významné míře^{12–23}, velmi užitečnými zdroji informací jsou i chemické encyklopedie^{24–26}.

Barviva můžeme dělit i podle barvy, chemického složení či struktury, způsobu vazby na materiál, biologické funkce v přírodním materiálu (chlorofyl, hemoglobin ...), fyzikálních vlastností (rozpustnost aj.) a podobně. V tomto článku se zaměříme na barevné přírodní látky, které jsou většinou sekundárními metabolity a přírodní barviva průmyslově významná a přidržíme se dělení podle chemických struktur.

1.1. Přírodní barviva živočišná

Nejdůležitějším klasickým barvivem získávaným z živočišných zdrojů je přírodní sepie, červenohnědá látka izolovaná z inkoustového vaku sépie obecné (*Sepia officinalis*) či obecně hlavonožců, barva, skládající se hlavně z melaminu. Německé jméno sépie Tintenfisch, inkoustová ryba, ukazuje, jak bylo v historii toto barvivo používáno, ještě před objevením inkoustu duběnkového.

Dalším barvivem je šarlatová či karmínová košenila z vnější krusty oplozených samečků mexického červce nopálového (*Dactylopius coccus* = *Coccus cacti*), žijícího na opuncii (nopál) a podobná, tzv. nepravá košenila, zvaná též alkermesová šťáva, červený prášek vyráběný ze zaslých samečků červce *Kermes ilicis* = *Coccus ilicis*, hmyzu žijícího na některých druzích ořešáků ve Středomoří a severní Africe. Byla dříve užívána hojně jako náhrada za mnohem dražší karmín z košenily. Tato červcová barviva obsahují hlavně karmínovou kyselinu.

Třetím příkladem známého živočišného barviva je tyrský purpur vyráběný z ulity ostranky *Murex*. Legendy tvrdí, že purpur objevila Helena Trojská, která při procházce po pobřeží viděla psa, který kousl do vyvrženého mořského živočicha, čímž se potřísnil purpurovou barvou. Jiná legenda praví, že papež Pavel II. v roce 1464 nahradil tyrský purpur mnohem lacinější nepravou košenilou.

1.2. Přírodní barviva rostlinná

Mnoho barviv je tradičně získáváno z kořenů, plodů, květů, kůry a listů různých rostlin. Červená barva z kořenů mořený barvířské (*Rubia tinctorum*) je v Evropě používána

údajně již od r. 800, další byla získávána z brazilského dřeva (*Caesalpinia echinata*), červené řepy (*Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* var. *vulgaris*), medvědice lékařské (*Arctostaphylos uva-ursi*) a světlice barvířské (*Carthamus tinctorius*). Zajímavým příkladem je i červený orcein, získávaný provzdušňováním amoniakálního extraktu z mechů *Rocella tinctoria*, *Ochrolechia tartarea* aj. Známé je i oranžové barvivo z blizen šafránu (*Crocus sativus*); jehož cena odpovídá tomu, že na 1 kg suchého koření je třeba sto tisíc květů. Zdrojem žlutého barviva býval heřmánek (*Matricaria recutita* či *Chamomilla recutita*), vítod hořký krátkokřídlý (*Polygala amara* subsp. *brachyptera*) či kručinka barvířská (*Genista tinctoria*) a hnědou poskytovala henna (*Lawsonia inermis*). Zdrojem zelené barvy může být šafrán a boryt barvířský (*Isatis tinctoria*), rdesno ptačí (*Persicaria maculosa*), rdesno červinec (*Polygonum persicaria*), listy šťovíku kyselého (*Rumex acetosa*), kopřiva dvoudomá a žahavka (*Urtica dioica*, *Urtica urens*) a ambrosie peřenolistá (*Ambrosia artemisiifolia*), kde půjde hlavně o chlorofyl. Modrou poskytne boryt barvířský (*Isatis tinctoria*) a indigo z indigovníku (*Indigofera tinctoria*).

Rostlinná barviva bývala v historii získávána, a jsou získávána v řemeslné praxi většinou i dnes, po roztlučení či rozřezání barevného materiálu, který byl louhován ve vodě zahřáté těsně pod teplotu varu; za této teploty byly barveny různé hmoty (tkaniny, vlákna) do roztoku ponořené. Často bylo při barvení používáno mořidlo, obvykle sůl, které usnadňuje vazbu barevné substance na barvený materiál pomocí nekovalentních vazeb různého druhu. Typickým mořidlem může být směs síranu hlinitého a kyselého vinanu draselného. Pokud jsou jako mořidla použity soli obsahující chrom, měď, cín či železo, může dojít k vybarvení materiálu i na změněnou barvu či odstín.

V současné době se některé látky z typů zde popisovaných dokonce využívají v rostlinné produkci např. jako přírodní antioxidanty²⁷, kde příkladem mohou být anthokyanová barviva z brambor²⁸. Jiným příkladem může být studium inhibice aldoseduktasy (EC 1.1.1.21, ALR2) rostlinnými chalkony²⁹, případně studium některých zde uvedených pyranových barviv jako fytoestrogenů³⁰.

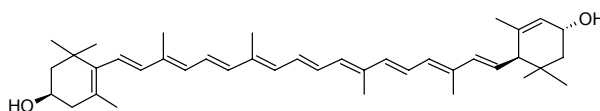
1.3. Přírodní barviva minerální

Nejběžnějším minerálním barvivem je okr, směs jílovitých hlín s charakteristicky barevnými oxidy. Jeho barva kolísá od typické okrové či světlé sieny s oxidem hořečnatým až po červenou s limonitem až hematitem. Tmavá umbra obsahuje oxid manganatý. Jako bílé pigmenty se používají vápenec, oxid titaničitý, podobně jako černé pigmenty saze a uhlík, zelené pigmenty malachit, modré pigmenty azurit a tyrkys a červené pigmenty rumělka a čisté oxidy a hydroxidy železa.

Pigmenty se používaly jako suspenze ve vaječném bílku, vodě, tuku či oleji. I zde se používaly nejrůznější příměsi, které zlepšovaly vazbu pigmentu na barvený materiál.

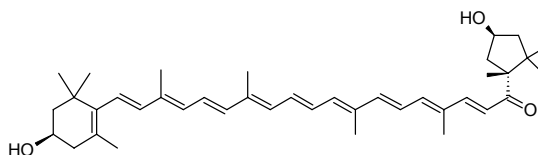
2. Polyenová barviva

Polyenová barviva jsou typicky lineární nenasycené konjugované uhlovodíky a jejich deriváty s většinou dvojných vazeb v konfiguraci *trans*. Jsou nerozpustné či prakticky nerozpustné ve vodě. Z nich patří k nejvýznamnějším žlutý lutein, který se vyskytuje ve vaječném žloutku a měsíčku lékařském (*Calendula officinalis*) či hojně v Mexiku pěstovaném afrikánu (*Tagetes lucida*), jehož se ročně sklídí 600 tisíc tun ve formě barevné moučky.

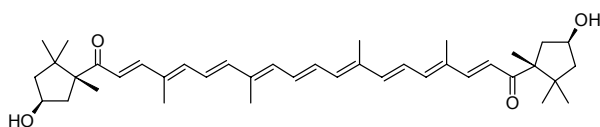


lutein

Barviva přítomná v luscích papriky (*Capsicum annuum*) jsou směsí karotenoidů, ve kterých převládá kapsanthin a kapsorubin. Tato barviva jsou v oleji rozpustná, stálá k teplu a pH; nejsou však stálá k působení světla. Sušený paprikový lusk se používá jako barvivo a koření a ročně se jej odhadem vyrobí 45 tisíc tun.

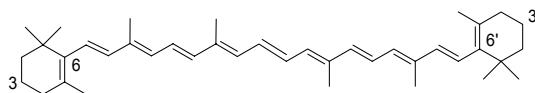


kapsanthin

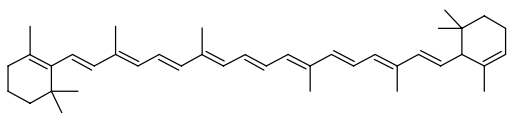
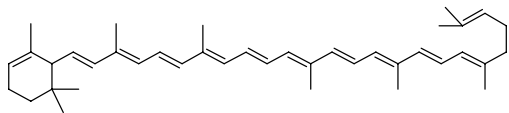
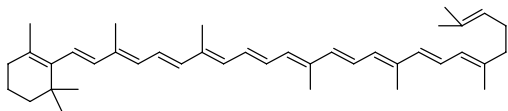
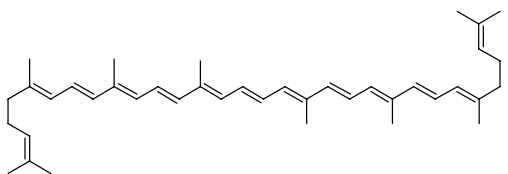
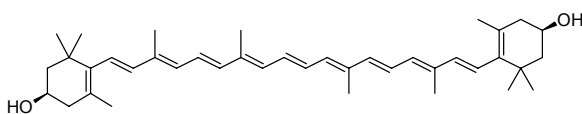


kapsorubin

Karoteny patří jak k významným přírodním oranžovým barvivům, tak k důležitým složkám naší stravy (provitaminy). Jak vidno z uvedených vzorců, příliš se od sebe neliší. β -Karoten patří k nejběžnějším, vyskytuje se v mrkvi (*Daucus carota* subsp. *sativus*) a patří k významným potravinářským barvivům (λ_{max} 497, 466 nm). Směs karotenů je označována jako E160a. Ukažme si na několika případech těchto látek diverzitu této knihovny sekundárních metabolitů

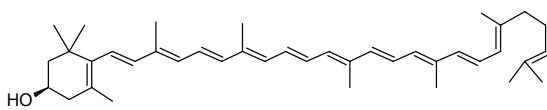


β -karoten

 α -karoten δ -karoten γ -karoten ψ -karoten

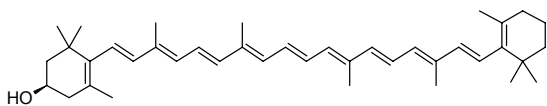
zeaxanthin

Zrna kukuřice (*Zea mays*) obsahují žluté barvivo zeaxanthin ($\lambda_{\max}$ 483, 451 nm), velmi podobné luteinu; oba se používají jako antioxidanty. Podobně plody šípku (*Rosa canina*) obsahují červený rubixanthin ($\lambda_{\max}$ 509, 474, 439 nm).



rubixanthin

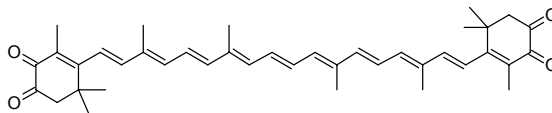
Kryptoxanthin z vaječného žloutku, obilí či plodů jahodníku (*Fragaria vesca*) je opět žlutý ($\lambda_{\max}$ 480, 452 nm).



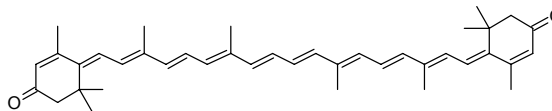
kryptoxanthin

Krásnou červenou barvu některých řas, mořských hub, ryb, uvařených krabů a humrů (*Homarus*) způ-

sobuje astacen (astacin) o $\lambda_{\max}$ 500 nm. Toto polyenové barvivo (CAS RN 514-76-1) je v literatuře často podle názvu zaměňováno za metalloproteinasu HMP1 astacin (CAS RN 143179-21-9) z podobného zdroje, langusty *Astacus astacus*.

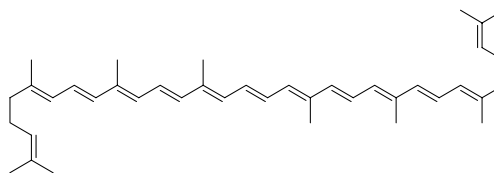


astacen



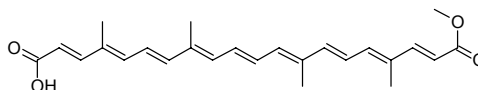
rhodoxanthin

Oranžovo-žlutý rhodoxanthin, který barví podzimní listí a je obsažen v jedovatých semenech tisu (*Taxus baccata*) a v řase *Chlorella* sp., nalezneme i v říši živočišné, např. v barvivech křídel některých holubů.



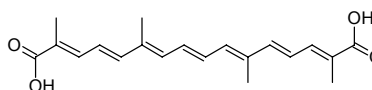
lykopen

Červený lykopen je příkladem nesubstituovaného polyenu. Je základním barvivem rajčete jedlého (*Lycopersicon*), $\lambda_{\max}$ 505, 472, 446 nm.

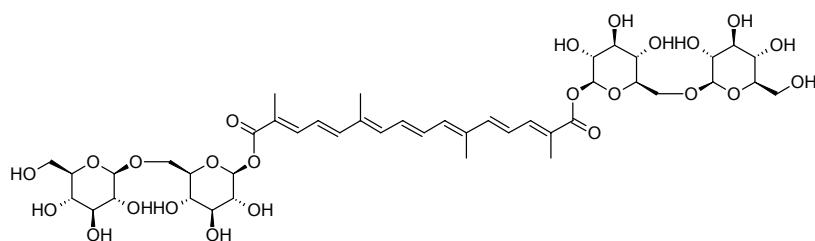


bixin

Annatto (annato) je červené, oranžové až zlatožluté barvivo ze semen tropického keře *Bixa orellana*. Hlavní barevnou složkou je bixin (*cis*-bixin $\lambda_{\max}$ 509, 475, 443 nm), monomethylester kyseliny diapokarotenové. Přítomen je i demethylovaný produkt norbixin, který se nalézá v pryskyřičnatém obalu obklopující semeno. V minoritních množstvích jsou přítomny i *trans*-bixin a *cis*-norbixin. Keř annatto je doma ve střední až jižní Americe, kde se semena používají jako koření. Objem světové roční produkce je odhadován na 10 tisíc tun, je používán jako potravinářské barvivo E160b.

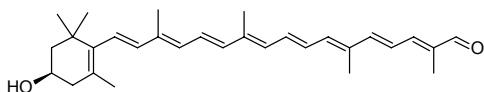
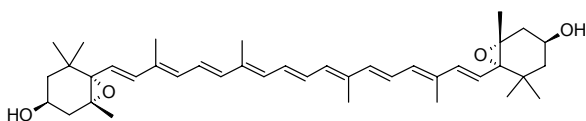


krocetin



krocin

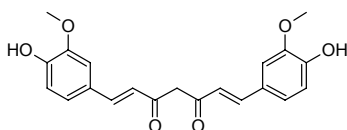
Krocin (krocetin bis-gentiobiosid, $\lambda_{\max}$ 464, 434 nm) se vyrábí z extraktu z vodorozpuštěného barviva z gardénie jasmínové (*Gardenia jasminoides*) a z červených pestíků šafránu (*Crocus sativus*). Barviva nejsou obchodně záměnná, neboť cena šafránu, ale i jeho vůně je v případě přírodního materiálu hodnocena velmi vysoko, protože jde o nejdražší koření na světě. Deglykosylovaný oranžový krocetin je vlastním nositelem barevnosti a je již nerozpustný ve vodě, $\lambda_{\max}$ 464, 436, 411 nm. Odhad světové roční produkce koření šafránu je 50 tun.

 β -citraurin

violaxanthin

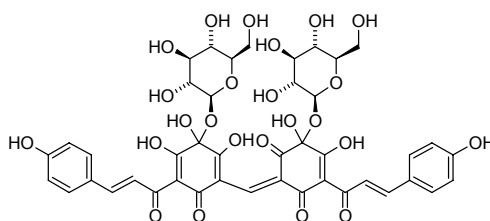
β -Citraurin zlatožlutý, $\lambda_{\max}$ 497, 467 nm, zvaný též sladká oranž či oranž „navel“, je karotenoidní barvivo nacházející se pouze v oplodí a plodech pomerančovníku (*Citrus sinensis*). Dalším barvivem ze slupek pomeranče je oranžovožlutý violaxanthin ($\lambda_{\max}$ 471, 442, 417 nm).

Kurkumin je nejvýznamnější barvivo nacházející se v oddenku kurkumy (*Curcuma longa*). Kurkuma je koření používané po mnoho tisíc let a my je známe jako žluté barvivo (E100) z koření kari. Pěstuje se v Indii, Číně a Pakistánu; prodává se jako jemně mletý sušený oddenek, který má kromě charakteristické barvy i významnou vůni. Světový obrat se odhaduje na 15 až 20 tisíc tun za rok. Lipofilní žlutooranžový kurkumin není rozpustný ve vodě a má $\lambda_{\max}$ 425 nm. Označuje se též jako přírodní žlut 3 anebo turmeric yellow. Používá se i v medicíně jako protizánětlivý prostředek a nově i pro potlačování projevů (demencí) Alzheimerovy choroby.



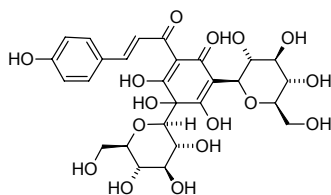
kurkumin

V přírodní kurkumě se vyskytují i sloučeniny bez jedné či obou methoxyskupin, demethoxykurkumin a bisdemethoxykurkumin.

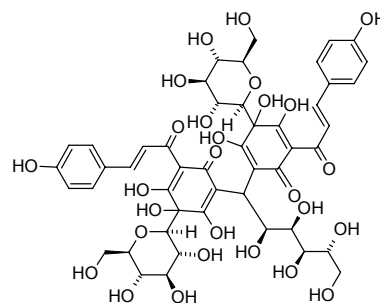


karthamin

Strukturně je polyenovým barvivům vzdáleně příbuzný i karthamin, který tvoří přirozený přechod mezi nimi a chalkony. Jeho zdrojem je světlice barvířská neboli saflor (*Carthamus tinctorius*), což je prastará kulturní olejnatá rostlina pocházející z východní Indie. Znali ji už staří Egypťané, Řekové a Římané. V polovysychavém oleji dominuje kyselina linolová (někdy nazývaná, zřejmě nesprávně, i vitamín F) a olej je tedy velmi vhodný pro lidskou výživu. Historicky se světlice používala v barvířství, dnes je její použití spíše okrajové. Květy obsahují tři hlavní glykosidová barviva: ve vodě téměř nerozpustný šarlatově červený karthamin a rozpustné „saflorové žlutí“ A



saflomin A



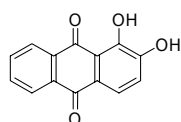
saflomin B

a B, tzv. saflomin A a B. Je zajímavé, že anglický termín pro označení byrokracie „red tape“ má původ v safloru, který se používal k barvení červených stužek užívaných ke svazování úředních spisů. Karthamin není stabilní na světle. Používá se na barvení tkanin (vlna a hedvábí), potravin, na výrobu líčidel a malířských barev. Někdy se používá na barvení rýže, cukrovinek a pečiva.

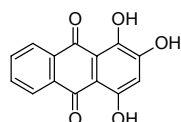
3. Chinonová barviva

Patří mezi barviva s dlouhou historií. Vzhledem k struktuře, která je často velmi rozmanitá, můžeme předchozí barviva, tj. karthamin a saflominy, považovat i za deriváty s chinoidní strukturou.

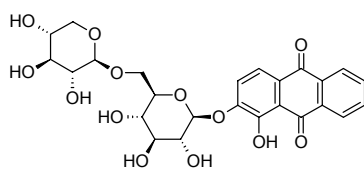
Jedním z hlavních zástupců této skupiny je alizarin, který se vyskytuje ve formě glykosidu (6'-O- β -D-xylopyranosyl- β -D-glukopyranosidu, tzv. ruberythrinové či ruberythrové kyseliny a je tudíž jakožto konjugát rozpustný ve vodě) v evropské mořeně barvířské (*Rubia tinctorum*) spolu s purpurinem, který je převážnou barevnou složkou mořeny rostoucí v Indii. Izolace vyžaduje hydrolyzu glukosidového prekurzoru obsaženého v kořenech. Alizarin poskytuje intenzivní červenou barvu po interakci s mořidlem, jímž bývá alkalický sulfát (alum, často *Alumen album* sulfát [kamenec] hlinito-draselný) a alkálie. Podle kationu mořidla je vybarvení materiálu různé od červené, fialové, oranžové, přes lila až ke hnědé. Důležitost přírodního alizarinu byla snížena jeho syntézou (prv syntetizované barvivo, již 1868). V přírodě se vyskytuje i v plevelu zvaném svízel povázka (*Galium mollugo*) a svízel vonný (*Galium odoratum*). Alizarin, dnes vyráběný uměle, se užívá na barvení textilií, tapet nebo jako malířská barva.



alizarin



purpurin

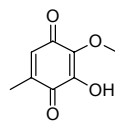


ruberythrinová kyselina

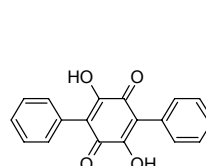
Alizarin je fenolická (kyselá) sloučenina, která může v závislosti na bazicitě prostředí ztrácet jeden nebo dva protony, a měnit tak uspořádání elektronů a v této souvislosti i barevnost. Při pH pod 10 dochází k deprotonaci hydroxylů v poloze 1 a 2 a látka se jeví v roztoku jako fialová ($\lambda_{\max}$ 565 a 610), při pH kolem 7 je deprotonována

pouze hydroxyskupina v poloze 1 a látka se jeví jako červená ($\lambda_{\max}$ 530). V prostředí kyslejší než pH 5,5 je oranžová ($\lambda_{\max}$ 435) s tím, že obě hydroxyskupiny jsou protonovány. Alizarin je tedy příkladem acidobazického indikátoru.

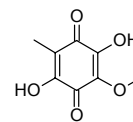
Jednoduché barevné chinoidní sloučeniny se vyskytují v některých plísních. Hnědý plísníový toxin s antibiотickými vlastnostmi fumigatin se vyskytuje v *Aspergillus fumigatus*. Bronzově purpurový spinulosin je sekundárním metabolitem *Penicillium spinulosum*.



fumigatin



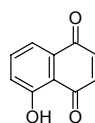
polyporová kyselina



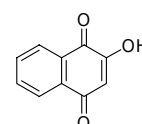
spinulosin

Příbuzná je temně fialová polyporová kyselina z *Polyporus viduans*, parazitické houby rostoucí na dubech.

Ořešáky, náš vlašský *Juglans regia* a příbuzné jako *J. cinerea*, *J. nigra*, či americké pekany *Carya illinoensis* a hikory *C. ovata*, obsahují zejména ve slupce ořechu volný juglon a jeho glykosid, případně glukosid trihydroxy-naftalenu, který po hydrolyze a oxidaci přechází na juglon, tmavé barvivo, používané k barvení na odstíny růžové a hnědé. Toto naftochinonové barvivo je známé také jako juglandová kyselina či nucin; krystaluje jako žlutooranžové krystaly ($\lambda_{\max}$ 420) rozpustné v benzenu, alkoholu a etheru, ale velmi špatně ve vodě. Krystaly se působením alkálií barví do tmavofialova a snadno se rozkládají. Každý, kdo někdy loupal vlašské ořechy, ví, jak dobré je juglon barvivo. Je sice mírně toxický, ale používá se ke stabilizaci nealkoholických nápojů, do opalovacích krémů a šamponů.



juglon

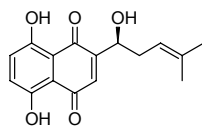


lawson

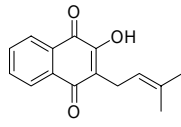
Strukturně příbuzným naftochinonem je lawson, který je hlavní barevnou složkou tradičního barviva henna (hena), což je prášek z mletých sušených listů a výhonků keře *Lawsonia inermis*. Barviva z henny jsou známa tím, že velmi dobře absorbují ultrafialové záření ze slunečního světla. Henna je známa i tím, že si s ní prorok Mohamed údajně barvil vousy. Dnes se používá pro barvení vlasů a ornamentální tetování barví na odstín hnědé či červeno-hnědé. Roční světová produkce henny je 9 tisíc tun.

Dalšími významnými barvivy jsou barviva z kamejníkového (alkanetového) kořene *Alkannae radix*.

Ten obsahuje červené barvivo alkannin (anchusin, alkanetová červen) používané v Evropě již od pradávna. Přípravuje se z kořene kamejníku barvířského *Alkanna tinctoria*, či orchanetu *Lithospermum tinctorium* jako barvivo pro kosmetické a potravinářské účely.

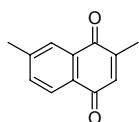


alkannin



lapachol

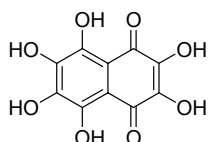
Strukturně příbuzný je žlutý lapachol z tropických dřev stromů *Tabebuia impetiginosa* a jiných zástupců r. *Tabebuia*, který má také antineoplastické vlastnosti.



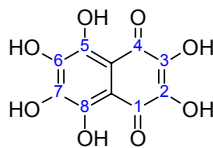
chimafilin

V plodu šeferdie kanadské (*Shepherdia canadensis*) se nachází žlutý naftochinon chimafilin.

Zajímavá skupina benzochinonů je z mořské fauny. Spinochromy (ze „spino“ pro páteř a „chrome“ pro barva) jsou získávány z mořských ježků (*Strongylocentrotus droebachiensis*, *Eucidaris tribuloides*). Jejich struktura je odvozena od spinochromu E, který je substituován či zbaven hydroxyskupiny. Sám spinochrom E má $\lambda_{\max}$ 533, 497, 462 nm. Ve výsledku má např. *Eucidaris tribuloides* nádherně purpurovou barvu.

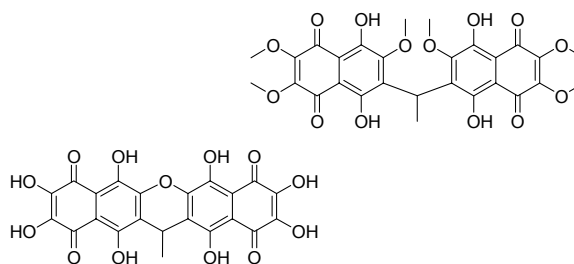


spinochrom E a číslování atomů



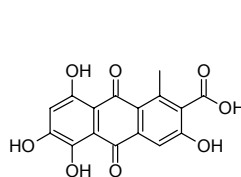
Jak spinochrom D postrádá hydroxyskupinu v poloze 7, tak spinochrom C má acetylovanou skupinu v poloze 3, echinochrom A má v poloze 7 místo hydroxyskupiny ethylovou, dehydroechinochrom má v poloze 7 místo hydroxyskupiny ethylovou a hydroxyly v polohách 2 a 3 jsou oxidovány na ketoskupinu. Trimethylechinochrom A má hydroxyly v polohách 2, 3 a 6 methylovány a v poloze 7 místo hydroxyskupiny ethylovou. Zdvojené spinochromy jsou přítomny také. Zajímavostí těchto sloučenin je, že pomocí snadno deprotonizovatelných hydroxyskupin mohou tvořit stabilní soli.

Košenila, zvaná též šarlat, karmín či magenta, je červené barvivo, použitelné i bez mořidel. Užívá se pro barvení na červenou, růžovo a purpurovo. Jde o přírodní substanci, získanou, jak již bylo řečeno, z rozdrčených těl oplodněných samic hmyzu červce nopálového (*Coccus cacti* či *Dactylopius coccus*), který žije na opuncích v Mexiku a střední Americe.

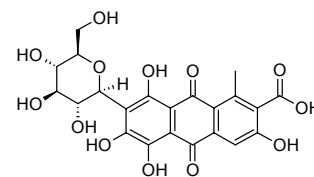


zdvojené spinochromy

Stejně barvy objevili archeologové v 1800 let staré textílii nalezené v Judské poušti. Mayové a Inkové používali toto barvivo ještě před tím, než byl hmyz pěstován uměle. Celková roční produkce tohoto druhu hmyzu je v současné době 300–350 tun. Je jednou z mála povolených krásně červených potravinářských barev (E120) a barví se jí např. nápoj Campari. Obsahuje dvě hlavní barevné látky: kyselinu kermesovou ($\lambda_{\max}$ 498 nm), která je fialovočervená v kyselině sírové, modrá v kyselině borité a fialová v alkalickém prostředí, a kyselinu karmínovou, černočervenou ve vodě a žlutou až fialovou v roztocích kyselin. Kyselina karmínová je z hlediska organické chemie jeden ze zástupců tzv. „C-glykosidů“ v přírodě.



kyselina kermesová

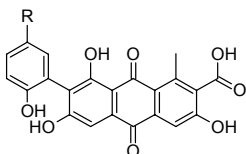


kyselina karmínová

Alkermesová šťáva, kermesové („chermes“) barvivo šarlatové či karmínové barvy, tzv. nepravá košenila, je červený prášek vyráběný ze zaschlých samic červce *Kermes ilicis* (dříve označovaný *Coccus ilicis*) hmyzu žijícího na některých druhích dubů v Evropě. Byla dříve užívána hojně jako náhrada za drahé barvivo karmín, např. i starými obyvateli Judeje a Římany. Chemická literatura zde mnoho nenapoví, neb existuje značné zmatení a propletení pojmů; nejpravděpodobnějším barvivem, obsaženým v *Coccus ilicis*, je kyselina kermesová, která je v řadě seriálních literárních pramenů označována synonymem kermes. Někdy je uváděna jako komponenta i kyselina xanthokermesová. Významný rozdíl mezi kermesem a košenilou lze nalézt v tom, že kermes je označován jako C.I. Natural Red 3 (podle CAS RN 18499-92-8, kyselina kermesová) a košenila C.I. Natural Red 4 (podle CAS RN 1260-17-9, kyselina karmínová). Pro dovršení zmatku je znám v literatuře i minerální kermes, jímž je sulfid antimonit a výrazem „kermes“ je také označován malý, stálezelený evropský dub *Quercus coccifera*, na kterém červc žije.

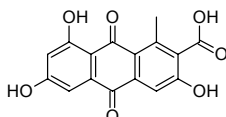
Strukturně příbuznými naftochinony jsou látky z tzv. lac, hmoty žlutočervené barvy získávané z výměšků indického hmyzu *Coccus laccae*. Světový obchod je zde menší

s pouhými 10 tunami ročně. Barvivo obsahuje lacaovou kyselinu A, B, C a D. Typy A–C se liší jen málo. Nejhojnější je typ A, zvaný též karmin.



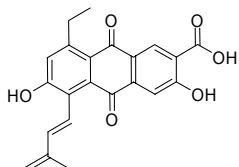
lacaová kyselina A–C

A, R = $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCOCH}_3$
 B, R = $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$
 C, R = $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$



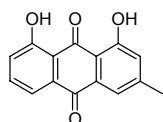
lacaová kyselina D

Lacaová kyselina D je zvaná též kyselina xanthokermesová a podobá se značně kyselině kermesové.

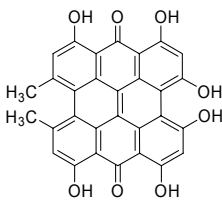


arpinková červeň

Penicillium oxalicum var. *Armeniaca* CCM 8242 z půdních vzorků produkuje arpinkovou červeň malinové barvy, která je velmi stabilní.



chrysofanová kyselina



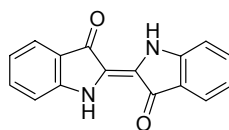
hypericin

Chrysofanová kyselina, barvivo z kořenů reveně bulharské (*Rheum rhaponticum*), se používá k barvení do žluta, oranžova a červena. Sama kyselina je žlutá (λ_{max} 436, 288, 278, 256 nm) a váže se dobře na keratin, proto se používá na barvení vlasů. V našich krajích rostoucí třezalka (*Hypericum*) obsahuje červené, fluoreskující barvivo hypericin, který může vyvolávat u dobytka citlivost na světlo.

4. Indolová barviva

Indigo, jedno z nejstarších člověkem používaných barviv, které bývalo významnou obchodní komoditou, je dnes vytlačeno syntetickými barvivy. Levi Strauss přestal barvit svoje montérky zvané „jeans“ indigem až v 19. století. Ročně se ho vyrobí z přírodních zdrojů asi 50 tun. Jeho zdrojem je indická rostlina indigovník *Indigofera*

tinctoria, či *I. suffraticosa*, případně evropský boryt barvířský (*Isatis tinctoria*), kde se nachází ve formě glykosidu indikanu.



indigo

Struktura (2*E*)-2,2'-biindol-3,3'-(1*H*,1'*H*)-dionu je formálně příbuzná výše popsaným chinonům i proto, že se snadno zapojuje do oxidačně-redukčních reakcí. Toto zapojení má důsledek i praktický. Jeho redukováná forma (indigoběl) je rozpustná ve vodě a může tak být nanesena např. na látku. Materiál je na vzduchu usušen, indigoběl se oxидуje a zmodrá (Schéma 1). Tím, že je špatně rozpustné ve vodě, indigo zůstane na látce. Taková barviva označujeme jako kypová.

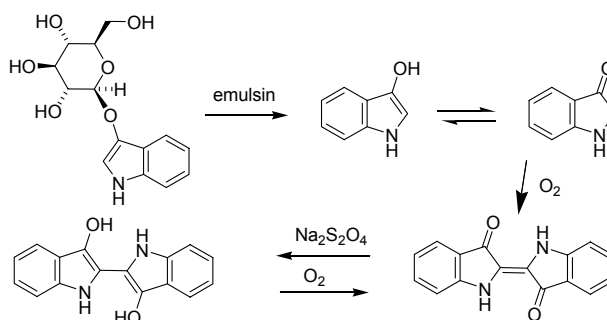
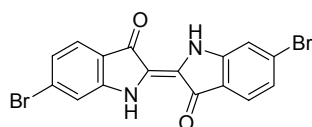


Schéma 1

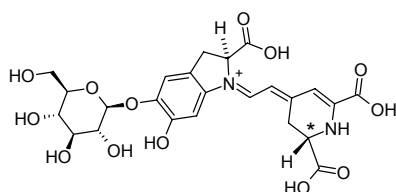
V literatuře je určitá neshoda, zda je indigo *trans* či *cis*. Chemical Abstracts uvádí pod CAS RN 482-89-3 *cis*-derivát jako přírodní indigo (indigotin), uvádí však indigo i pod číslem 68651-46-7, avšak bez uvedení struktury. Pod označením CAS RN 33934-64-4 je např. uvedeno *N,N'*-diacetylindigo avšak v konfiguraci *trans*. Výpočty molekulární struktury však prokázaly, že vypočtená struktura je blíže isomeru *trans*³¹.

Bromovaný derivát indiga, dibromindigo, je známé purpurové barvivo, tzv. punicin antický (tyrský purpur) z měkkýšů *Murex*. Tento, též zvaný císařský (imperální) purpur, byl vyráběn již starými Féniciany z ulit ostranek *Murex brandaris*, *Murex trunculus*, *Helix ianthina* nebo *Purpura lapillus*.

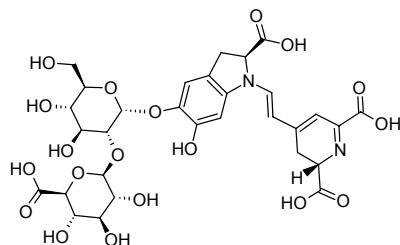


punicin

Dalším derivátem indolu je betanin z červené řepy (*Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* var. *vulgaris*) E162, se kterým se běžně setkáváme např. v jogurtech, které mají vypadat jakoby obarvené borůvkami a podobně.



betanin

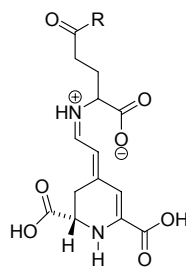
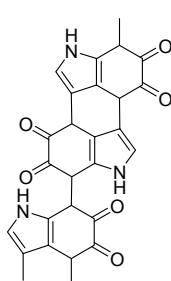


amaranthin

Barvivo je sytě tmavočervené a lze jím barvit na odstíny rezavě červené až růžové. Barvivo není příliš stálé a časem bledne. Při pH běžných v potravinách nedochází ke změnám barvy. V kyselém prostředí pod pH 3,5 je betanin červenofialový (λ_{max} 535 nm), v tomto rozmezí pH dochází ke změnám disociace a vytváření zwitteriontových struktur, při kterých však barva není významně ovlivněna. Při změnách pH mezi 3,5 a 7,0 se fialový tón prohlubuje (λ_{max} 538 nm), což je spojeno s tím, že fenol za těchto podmínek deprotonuje. V alkalickém prostředí se dusík v šestičlenném kruhu při pH 9,0 až 10,0 zbavuje protonu a přechází z kvarterního na normální trojvazný; barva se změní na fialovou (λ_{max} 544 nm). Deprotonace hydroxylů cukerné části v silně alkalickém prostředí (pH 12–14) na barevnost nemá vliv.

Vedle betaninu a isobetaninu (má opačnou konfiguraci na uhlíku označeném hvězdičkou) je v řepě přítomen ještě žlutý vulgaxanthin I a II.

Betaninu podobné červenofialové barvivo amaranthin je z laskavce (amaranthu), který se pěstuje jako obilovina pro velmi jemný škrob a vysoký obsah bílkovin. U nás jsou známy ozdobné kultivary. Všechny jsou začleňovány do skupiny betacyaninů. Syntetické barvivo amaranth CAS RN 915-67-3 je však odlišné struktury.

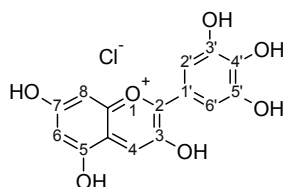
vulgaxanthin
I, R = OH
II, R = NH₂

strukturní fragment melaninu

Mezi indolová barviva řadíme i melaniny, které způsobují tmavé zabarvení peří, kůže, šupin, očí, některých vnitřních membrán, kutikul hmyzu, hlíny a některých hub. Albíni melaniny netvoří.

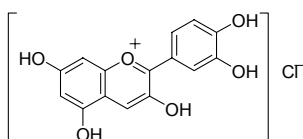
5. Pyranová barviva

K nejdůležitějším pyranovým barvivům patří anthokyaniny (lat. anthos – květ), obecně se vyskytující jako glykosidy, jejichž kombinace mohou být nejrůznější. Nejběžnější jsou glykosylovány v polohách 3 a 5, zřídka 7, 3' a 4'. Jejich barva je tmavá, např. červená, modrá a fialová. Jejich barevnost a barevná modifikovatelnost je jedním z divů přírody, která nás obklopuje. Zajímavé je i to, jakou bohatost barev dokázala příroda stvořit z několika aglykonů, které jsou různě konjugovány s cukernými zbytky. Jako cukerná složka se uplatní D-glukosa, L-rhamnosa, D-arabinosa, rutinosa (α -L-rhamnosyl-(1→6)-D-glukosa) a soforosa (β -D-glukosyl-(1→2)-D-glukosa).



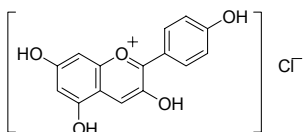
číslování anthokyanidinů

Kyanidin má v kyselém prostředí červenou barvu (květy růže *Rosa*, plody třešně *Cerasus avium*, brusinky *Rhodococcum vitis-idaea*, aj.) a v alkalickém modrou (chrpa modrák, *Cyanus segetum*), opět se zde uplatní známý efekt, kdy se změnou pH dochází k protonacím a deprotonacím a tím k přeskupování elektronů interagujících s fotony viditelného světla. Barevnost je v případě obdivovaných barev podzimního listí, ve kterém degraduje chlorofyl a vystupují m.j. karotenoidy, ovlivněna i komplexací s kovy a skládáním barevných molekul do supramolekulárních uskupení. Proto je paleta podzimu tak rozmanitá v závislosti na kyselosti a alkalitě půd a obsahu různých kationtů v nich.

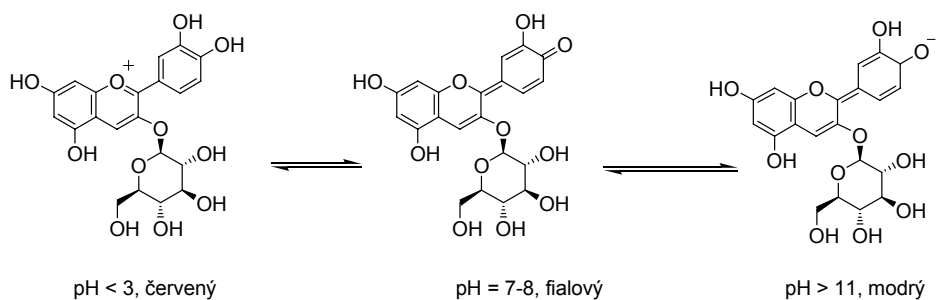


kyanidin

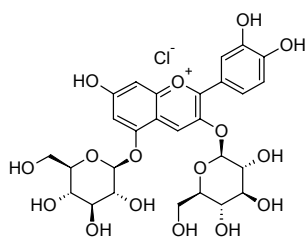
Jak je vidět z připojených vzorců, jsou tyto látky obvykle znázorňovány jako oxoniové soli. Může to být i proto, že jsou po izolaci z protického prostředí jako soli izolovány a takto i charakterizovány.



pelargonidin

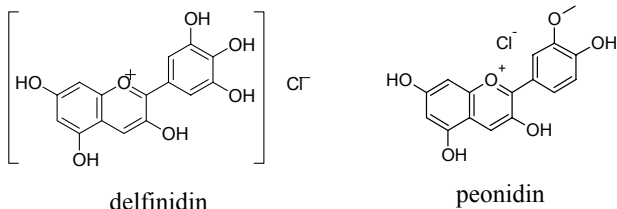


3-O-β-D-glukopyranosylkyanidin

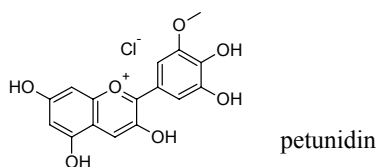


kyanin, 3,5-di-O-β-D-glukopyranosylkyanidin

Dalšími zástupci anthokyaninů jsou červený pelargonidin z pelargonie *Pelargonium*, hnědý delfinidin z červeného vína a jeho temně purpurový glukosid myrtillin, poslední se vyskytuje též ve violce *Viola tricolor*.

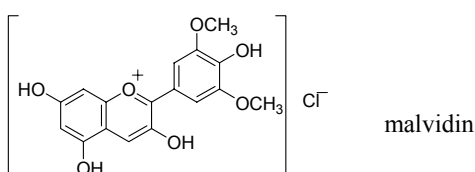


Peonidin z tmavočervených pivonek *Paeonia officinalis*, je aglykonem peoninu. Peonidin je červenohnědý málo rozpustný ve vodě a jeho alkoholový roztok je purpurově červený. Šedohnědý petunidin z petúnií *Petunia hybrida* a vítodu hořkého krátkokřídleho (*Polygala amara* subsp. *brachyptera*) je aglykonem petuninu, který je v pevném stavu fialový s měděným leskem.



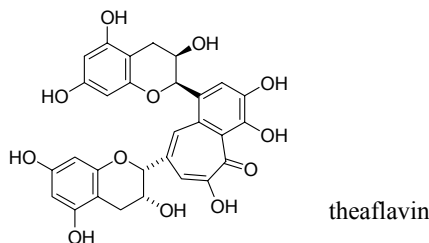
Malvidin se nachází ve formě červenohnědého diglukosidu malvinu v prvosenkách (*Primula*) a slézu lesním *Malva sylvestris* a jako monoglukosid v modrém hroznu z révy (*Vitis vinifera*). Po rozpuštění v methanolu je roztok

zprvu purpurový a postupně z něho vypadávají červené krystaly, které jsou však v procházejícím světle fialové.

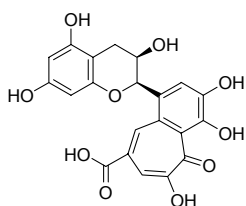


Podobně jako morin (viz dále) se v barevných dřevěch vyskytuje světle růžový catechin, používaný proto, že na vzduchu hnědne, jako laciné hnědé barvivo. Tento flavonoid se nachází jako (+)-catechin spolu s isomerem (–)-epikatechinem (který je *cis*, tj. konfigurace hydroxyly je opačná). Nachází se v dřevě khadiru či gambiru *Acacia catechu* a dřevě mahagonu neboli svietenie *Swietenia*.

Světle růžový (–)-epikatechin je součástí listových flavanolů, které tvoří podstatnou část fenolických sloučenin v čaji vyráběného z listů kamélie čínské či čajovníku čínského *Camellia sinensis*, a které jsou odpovědné za charakteristickou barvu a chuť čaje. K dalším patří theaflavinová kyselina, theaflavin a jeho estery s kyselinou gallovou.

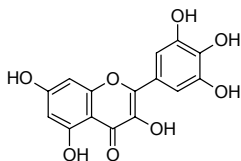


Anthoxanthiny jsou s anthokyaniny příbuzné tak, že v poloze 4 mají karbonylovou skupinu. Nejsou tak tmavé barvy, převážně jsou žluté (xanthos) až hnědé, někdy do oranžova. Jsou děleny na flavonoly a flavony, které navíc postrádají hydroxyl v sousedství karbonylu (v poloze 3). Přispívají k barevnosti řady rostlin, jejich plodů a dřev. Je

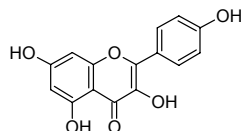


theaflavinová kyselina

všeobecně známo, že různá barva, vůně a tvar květů přitahuje jiný typ opylovačů, vztah mezi barvou květů a typem opylovače je alespoň částečně závislý na obsahu těchto barviv. Podívejme se nejprve na zástupce flavanolů.



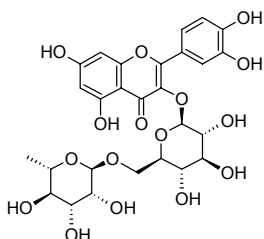
myricetin



kempferol

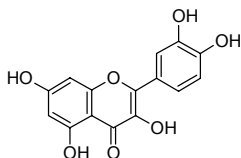
Myricetin a jeho 3-glukosid se nacházejí v rybízu (*Ribes*). Kempferol a jeho 3-glukosid přispívají k barevnosti plodů rybízu a broskvoně obecné (*Persica vulgaris*).

Kvercetin z vnitřní kůry dubu *Quercus velutina*, je oranžovohnědý a vyskytuje se také v chmelu, čaji, kaštanu jírovci maďalu. Je to aglykon rutinu z routy vonné (*Ruta graveolens*) a jeho biologická účinnost je velmi zajímavá, neb ovlivňuje průchodnost buněčné stěny. Rutin bývá označován jako vitamin P a používá se k léčení zvýšené lomivosti a propustnosti krevních vlásečnic, poruch funkce žil dolních končetin a při hemoroidech.

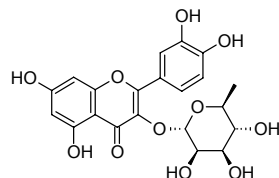


rutin

Rutin je světle žlutý a málo rozpustný ve vodě. Obsažen je i v řebříčku *Achillea* a jinanu dvoulaločném *Ginkgo biloba* či pohance seté (*Fagopyrum esculentum*) a mnoha dalších rostlinách.



kvercetin

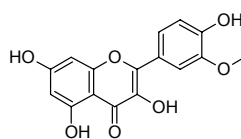


kvercitrin

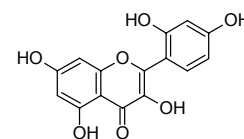
Kvercetin je aglykonem kvercitrinu; je glykosylován obvykle v poloze 3. Pokud je glykosylován D-galaktosou

najdeme jej v jabloni (*Malus domestica*), L-rhamnosou tamtéž a navíc v švestce (*Prunus domestica*), révě vinné (*Vitis vinifera*) a jinanu, D-glukosou tamtéž a navíc broskvoni (*Prunus persica*), meruňce (*Prunus armeniaca*), švestce, třešni ptačí (*Cerasus avium*), rybízu.

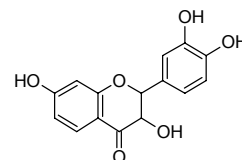
Kvercitrin je žlutooranžová látka izolovaná m.j. z jinanu, zřejmě nejstaršího dosud žijícího druhu stromů, podle geologických údajů druhu starého 150–200 mil let. Čínští mnichové jej považovali za svatý strom, protože jeho léčivé schopnosti jsou velmi zajímavé a droga se používá jako lék m.j. i při Alzheimerově chorobě. Jinan patří k nejlépe prozkoumaným léčivým drogám na světě, zřejmě pro svoje významné farmakologické účinky, za které zodpovídají zejména flavonoidy a terpenické sloučeniny. Kromě rutinu a kvercitrinu obsahuje listová droga jinanu kempferol a isorhamnetin.



isorhamnetin

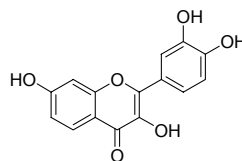


morin

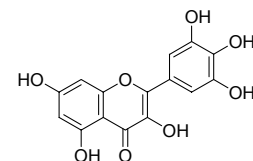


fustin

Morin je dalším zástupcem flavanolových barviv, který se nachází v dřevěch stromů a který se používá v chemické laboratoři. Postříkují se s ním destičky TLC, aby je bylo možno detegovat UV světlem. Morin v ultrafialovém světle fluoreskuje a tam, kde je na desce skvrna adsorbované látky, je tato fluorescence zhasena. Je rozpustný v alkoholu a používá se k barvení vlny. Jako příklady přírodního výskytu uvedme dřeva stromů chlebovníku žakii *Artocarpus heterophyllus*, makluře *Maclura pomifera*, fustiku *Chlorophora tinctoria* (také zvaném *Maclura tinctoria* anebo *Morus inctoria*) z Ameriky, a indické moruše *Morinda citrifolia* z Asie. Ve žlutém dřevě *Morus inctoria* se vyskytuje volně nebo ve formě vápenaté soli; vodný extrakt tohoto dřeva se používá k barvení cigaret a doutníků. V některých dřevěch se vyskytuje spolu s fustinem (dihydrofisetinem). Tato dřeva jsou dnes relativně vzácnými komoditami.

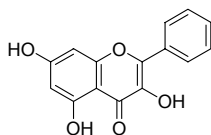


fisetin

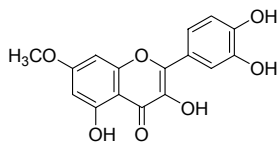


myricitrin

Žlutý flavonoid fisetin je přítomný v kůře a dřevě mnoha stromů; izolován byl např. z *Rhus cotinus*, ruj vlasatá. Žlutý myricitrin byl izolován z kůry myrty *Myrica nagi*.

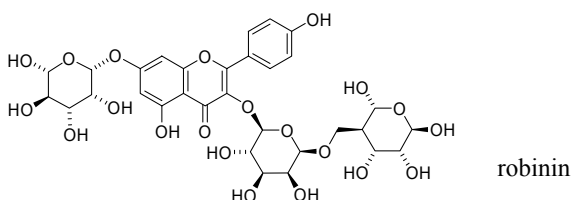


galangin

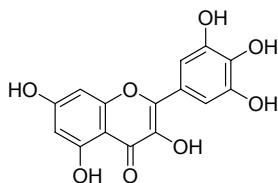


rhamnetin

Lehce žlutý galangin je izolován z kořenů galangy, *Alpinia officinarum*. Žlutý rhamnetin je aglykonem xanthorhamninu, vyskytuje se v plodech řešetláku počistivého *Rhamnus cathartica*.



robinin

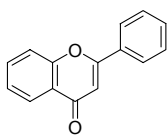


myricetin

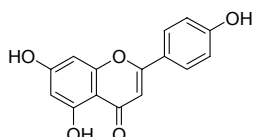
Žlutý robinin je dimorfní flavonoid izolovaný z listů a květů trnovníku (akátu) bílého *Robinia pseudacacia*. Žlutý myricetin se vyskytuje v kůře stromu *Myrica nagi*.

Další skupinou jsou flavanoly, jejich barva je obvykle také žlutá. Nejjednodušším zástupcem je flavon.

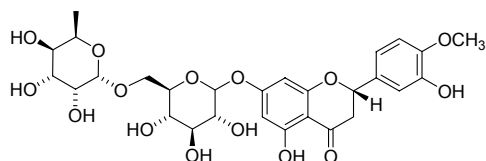
Žlutý ($\lambda_{\max}$ 350, 405 nm), ve vodě nerozpustný flavon byl izolován z prvosenky žahavé *Primula malacoides*, Franch., apigenin téže barvy byl izolován z petržele *Petroselinum crispum*, celeru *Apium graveolens* a heřmánku *Matricaria recutita*.



flavon

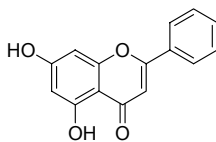


apigenin



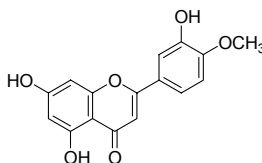
hesperidin

Žlutý málo rozpustný ve vodě hesperidin, též zvaný cirantin, byl izolován z citrusů, citronů (*Citrus limon*) a pomerančů (*Citrus sinensis*). Hesperetin téže barvy je jeho aglykonem.

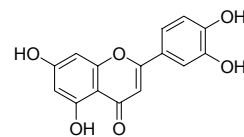


chrysin

Žlutý chrysin se nachází ve vnitřních částech dřeva douglasek *Pinus monticola*. Uvádí se jeho výskyt i v květech topolu bílého *Populus alba*.

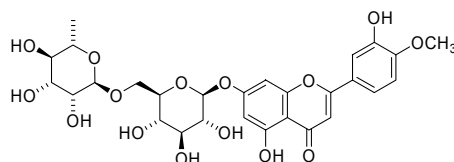


diosmetin



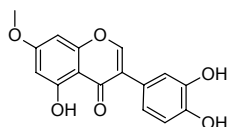
luteolin

Diosmin a jeho aglykon diosmetin jsou žluté látky, které se vyskytují např. v citronech *Citrus limon*. Strukturálně blízký demethylovaný žlutý luteolin, též zvaný digitoflavon, je ve formě 5-glukosidu, galuteolinu, izolován ze semen jeřábiny lékařské *Galega officinalis*, a žlutý luteolin 7-glukosid, zvaný cynarosid, se nachází v řebříčku obecném *Achillea millefolium*. Nať rýty barvířského, rezeď (*Reseda luteola*) a kručinka barvířská *Genista tinctoria* v listech a květech obsahují žluté barvivo luteolin, které se používá k barvení látek (např. plátna a vlny).



diosmin

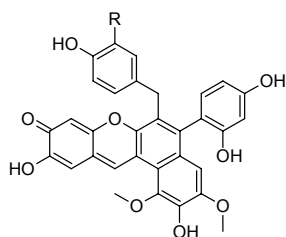
Výše zmíněný přírodní flavonový glykosid, rhamnoglykosid diosmetinu, je izolován z řady zdrojů, mimo citronovou kůru (*Citrus limon*) z routovité *Zanthoxylum avicennae* a květů novozélandského stromu jerlínu kowhai (pelu-pelu) *Sophora microphylla*.



santal

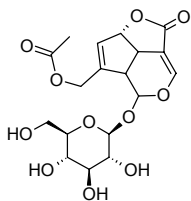
Žlutý isoflavonový pigment santal je přítomen jako jedna z barevných látek v santalovém dřevě (*Santalum album*).

Dále se v santalovém dřevě nacházejí i červené santaliny, jimiž přecházíme ke složitějším pyranovým derivátům. Santaliny jsou jakožto fenoly rozpustné v alkáliích

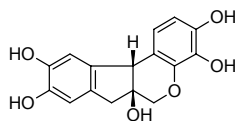


R= OH, santalin A,
R= OCH₃, santalin B

a organických rozpouštědlech, ve vodě nikoli. Roční světová produkce dřeva je 50 tun.

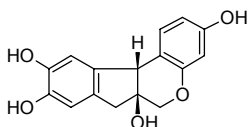


asperulosid

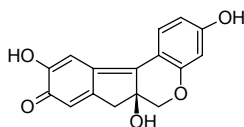


haematoxylin

Žlutý asperulosid zvaný též rubichlorová kyselina se nalézá ve svízeli vonném *Galium odoratum* a svízeli přítule *Galium aparine*. Vnitřní část dřeva stromu *Haematoxylum campechianum* obsahuje cca 10 % bezbarvé sloučeniny, haematoxylinu, který m.j. vyniká tím, že je 12 × sladší než sacharosa. Tato sloučenina na vzduchu oxiduje na červený až fialově modrý haematoxin (haematein). Světový roční obrát je cca 600 tun dřeva. Alkoholický roztok haematoxylinu (0,2 %) se používá jako indikátor. Je žlutý až oranžový v kyselých roztocích a purpurový v alkalických. Jeho roztok se také používá k barvení mikroskopických preparátů. Čerstvě připravený roztok haematoxylinu nebarví. Pokud je však oxidován na haematein, je možno jej použít s amoniakovým mořidlem, které urychluje zrání barviva, k barvení na červenou. Pokud takto obarvenou látku vypereme ve vodě, zmodrá.

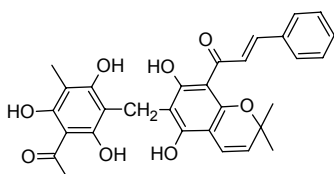


brazilin



brazilein

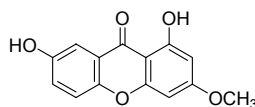
Americké dřevo „brazilwood“ *Caesalpinia echinata* obsahuje ve vodě rozpustnou sloučeninu, brazilin, která přechází oxidací na červené barvivo brazilein. Použitím různých mořidel lze barvit jeho pomocí na jasně červený odstín. „Brazilwood“ byl ve středověku jedním z nejdůležitějších barviv. Jeho sláva skončila v 19. století a dnes je jeho produkce zanedbatelná.



rottlerin

Stále zelený keř *Mallotus philippensis*, kamalský strom opičí tváře, vylučuje z plodů červený rottlerin, který lze izolovat i z kořenů této rostliny. Světová produkce tohoto kdysi populárního barviva není známa. Zařadit jej můžeme i mezi rostlinné chalkony.

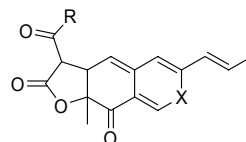
Na závěr této kapitoly uvedme vyšší homolog pyronu, xanthon a jeho deriváty. Patří k nim gentisin.



gentisin

Gentisin je světle žluté xanthonové barvivo z kořenů hořce *Gentiana* sp. o $\lambda_{\max}$ 410, 315, 275 a 260 nm, které charakteristicky barví pravou slovenskou „koreňovici“.

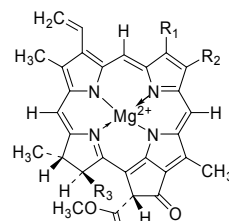
Zajímavé jsou přírodní barvy „Anka“ (ang-kak), které se používají v potravinářství, ovšem mimo Evropu a USA, mající původ v houbě *Monascus*, která se hojně vyskytuje v mnoha variacích, např. na bramborách, rýži a jiných potravinách.



Vyskytují se v řadě variant, např. R = C₅H₁₁, X = O purpurový rubropunctatin, X = NH oranžový rubropunctamin, R = C₇H₁₅, X = O oranžový monascorubrin a X = N purpurový monascorubramin. Strukturně příbuzné ankaflavin a monascin jsou žluté.

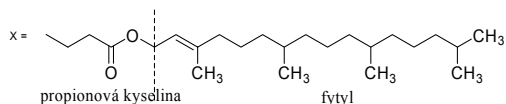
6. Oligopyrrolová barviva

Mezi nejznámější oligopyrrolová barviva patří zelené chlorofyly z rostlin, jež se účastní fotosyntézy, a červený hem z hemoglobinu, který se účastní přenosu kyslíku. V organismu je hem vázán na bílkoviny, jako nař. globin přes histidinový zbytek.



Chlorofyl a
Chlorofyl b

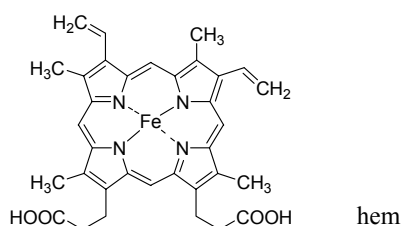
R₁ CH₃
R₂ CH₂CH₃
R₃ X



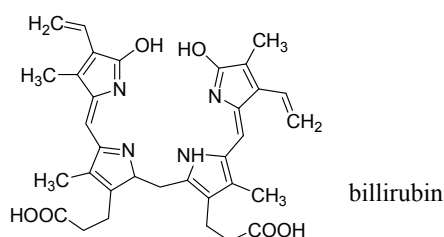
propionová kyselina

fytyl

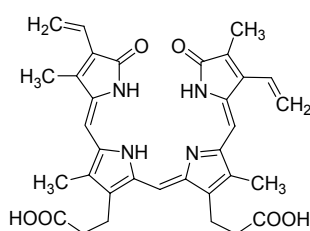
chlorofyl



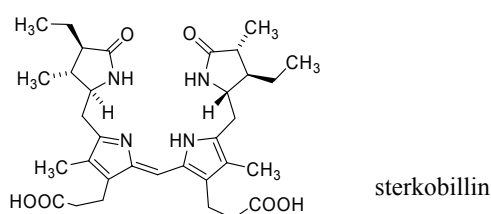
Hemoglobin je strukturně podobný myoglobin, což je jednořetězcový hemoprotein, sekvenčně i konformačně homologní s β -podjednotkou hemoglobinu. Myoglobin je část sarkoplazmatického proteinu svalu a je odpovědný za více než 90 % barevnosti masa. Jeho koncentrace ve sva-lech je proměnlivá. Je ve vodě rozpustný, též se rozpouští ve zředěných roztocích solí. V obou se na atom železa v hemu může vratně vázat molekula kyslíku.



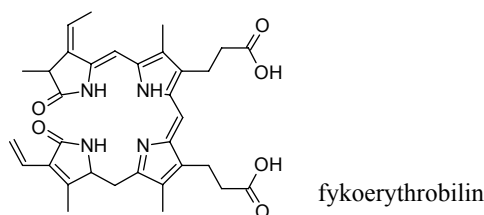
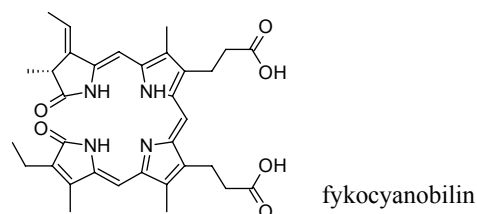
billiverdin



Billirubin (píše se i s jedním l) je hlavní barvivo žluči, je oranžově červený a tvoří se oxidací hemu. Vyskytuje se konjugován jako glukuronid. Zelený billiverdin je také ze žluči.



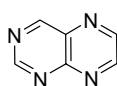
(-)-Sterkobillin je jeden z oranžově žlutých urobillinů, který se tvoří ve střevech další obměnou metabolitů hemu.



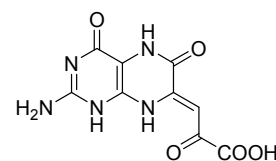
Biliny fycocyanobilin a fycocerythrin jsou připoje-ny k cystinovému zbytku apoproteinu thioetherovou vaz-bou. Jsou to červená a modrá barviva ze tří oddělení řas, *Rhodophyta*, *Cyanophyta* a *Cryptophyta*. Jsou to chemicky tzv. tetrapyrroly s otevřeným kruhem, jsou děleny podle barevnosti na modré fycocyaniny, červené fycocerythrin a lehce modré allofycocyaniny. Tyto pigmenty z řas mají do budoucna velký potenciál jako přírodní barviva potra-vin, kosmetiky a léků. Fycocerythrin se používá jako fluo-rescenční značka v imunochémii.

7. Pteridinová barviva

Skupina barviv patřících mezi pteriny je odvozená od bicycklého heterocyklu pteridinu. Prvý žlutý pigment byl izolován z křídel motýlů (řád *Lepidoptera*) již v roce 1889, skupina těchto pigmentů byla nazvána pteridiny (pteron = řecky křídlo). Poměrně vysoké koncentrace pterinů se nacházejí jako pigmenty u hmyzu, obojživelníků, plazů a ryb.

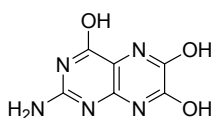


pteridin

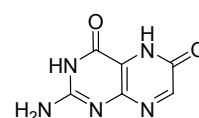


erythropterin

Červený erythropterin a žlutý leukopterin jsou obsa-ženy v křídlech motýlů, barvě mloků a mořském plankto-nu.



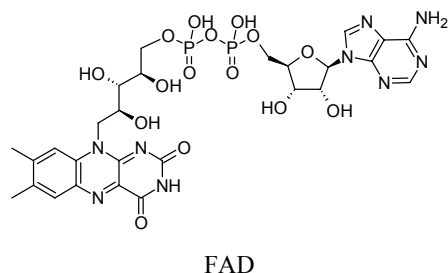
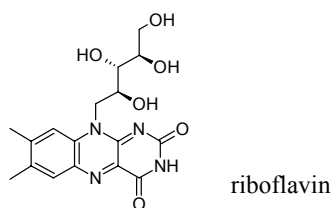
leukopterin



xanthopterin

Oranžový xanthopterin se kromě motýlích křídel vy-skytuje i v krabech, hmyzu a lidské moči.

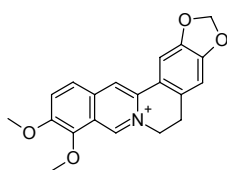
Riboflavinová žluť, derivát pteridinu, označovaná též jako E101 anebo vitamin B2, fluorescentní žluté barvivo (*flavus* je latinsky žlutý), se volná nachází pouze v retině oka. Nalézá se v přírodním materiálu konjugovaná jako riboflavin monofosfát v játrech, tučných rybách (rybím tuku/oleji), mléčném tuku, tučných mléčných výrobcích, žloutcích, avokádu, ústřicích, ořechách, luštěninách, zrní,



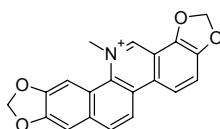
brokolici, špenátu, chřestu a podobně; případně se vyskytuje také jako flavinadenindinukleotid (FAD).

8. Isochinolinová barviva

Kořen krvavěnky *Sanguinaria canadensis* se již v prehistorických dobách používal k barvení na oranžovo, růžovo a červeně. Krvavě červenou šťávu můžeme dostat z oddenku rostliny.



berberin

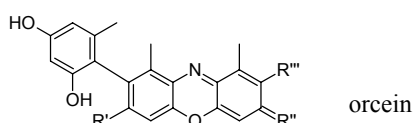


sanguinarin

Šťáva obsahuje isochinolinové alkaloidy, jmenovitě sanguinarin (bezbarvý alkaloid, jehož soli jsou červené; je antimikrobiální a účinkuje proti plaku) a řadu dalších, včetně žlutého berberinu. Jedovatý berberin je obsažen také v keři dřevitáku obecném (dráči) *Berberis vulgaris*, vlašovičniku větším *Chelidonium majus* (se sanguinariem) a orlíčku obecném *Aquilegia vulgaris*.

9. Ostatní barviva

Orcein je směsí látek s fenoxazonovou strukturou typu hydroxy-orceinů, amino-orceinů a amino-orceiniminů, z nichž např. derivát $R', R'' = OH$, $R''' = H_2$, se nazývá α -hydroxyorcein.



Orcein a orchil jsou barviva z tzv. archilu, lišejníků *Rocella tinctoria*, *Ochrolechia tartarea* (syn. *Lecanora tartarea*), *Everina prunastri*, z druhů *Parmelia*, *Umbilicaria* a *Lasallia*. Obecně jde o směs červených, purpurových a fialových barviv, získávaných z lišejníků působením amoniaku.

10. Přehled potravinářských „čech“

Vzhledem k tomu, že nás přírodní i syntetická barviva obklopují ze všech stran, je jejich použití v mnoha výrobcích regulováno. Znakem takové regulace je jednak evidence povolených barviv a na straně druhé stanovení povolených koncentrací. Z důvodů snadné evidence mají potravinářské barvy přiděleny evidenční symboly, které je charakterizují. Uvádíme seznam těchto symbolů s uvedením významu.

E100, kurkumín; E101, riboflavin (vitamin B1) a riboflavin-5'-fosfát; E102, tartrazin; E104, chinolinová žluť; E107, žluť 2G; E110, oranžová žluť S (žluť SY); E120, karmín pravý (košenila); E121, citronová červeň 2; E122, azorubin; E123, amarant; E124, košenilová červeň A (ponceau 4R); E127, erytrosin; E128, červeň 2G; E131, patentní modř V; E132, indigotin (indigokarmín); E133, brilantní modř FCF; E140, chlorofyly (i) a chlorofyliny (ii); E141, chlorofylové (i) a chlorofylinové (ii) komplexy s obsahem mědi; E142, brilantní zeleň kyselá (lisaminová zeleň); E143, fast green FCF (stálá zelená); E150, karamel; E151, černá brilantní BN; E153, medicínální uhlí; E154, hněd FK; E155, hněd HT; E160a, alfa, beta, gama-karoten (provitamin A); E160b, bixin, norbixin (Annato, Orlean); E160c, kapsantin (kapsorubin, paprikový extrakt); E160d, lykopen (rajčatová žluť); E160e, beta-apo-8-karotenal; E160f, ethylester kyseliny beta-apo-8-karotenové; E161a, flavoxantin; E161b, lutein; E161c, kryptoxantin; E161d, rubixantin; E161e, violaxantin; E161g, kantaxantin; E162, betanin (červeň z červené řepy); E163, antokyany; E166, santalové dřevo; E170, uhličitán (i) a hydrogenuhličitán (ii) vápenatý; E171, oxid titaničitý; E172, oxidy a hydroxidy železa (hnědý, červený, žlutý, černý); E173, hliník; E174, stříbro; E175, zlato; E180, rubínový pigment (litholrubin BK).

11. Závěr

Nahlédnutí do kuchyně přírody, která v nepřeberné knihovně sekundárních metabolitů stvořila i látky, které jsou barevné a jako barviva i často slouží, je drobnou pomůckou, která může být významná pro potravinářského, farmaceutického (jak je např. uvedeno v odstavci 1.2.), či kteréhokoliv chemika, neboť může napomoci širšímu využití citovaných látek v rámci „obnovitelných zdrojů“ zelené chemie. Výčet barviv zde uvedených je nutno brát jako ukázkou několika zajímavých příkladů ilustrující nepřebernou krásu chemie přírodních látek, které mohou být považovány za typické příklady, a nikoli jako vyčerpávající

přehled. Pro další informace odkazujeme na uvedené literární zdroje. QBFFFS.

Autoři tímto děkují MŠMT za podporu v rámci výzkumného záměru č. MSM6046137305. Dále děkují doc. RNDr. Lubomíru Opletalovi, CSc. za významnou pomoc se správnou botanickou nomenklaturou.

LITERATURA

- Dean J.: *The Craft of Natural Dyeing*. Search Press (1995) ISBN: 0855327448.
- Liles J. N.: *The Art and Craft of Natural Dyeing: Traditional Recipes for Modern Use*. University of Tennessee Press, Knoxville (1990) ISBN: 0870496700.
- Buchanan R.: *A Dyer's Garden: From Plant to Pot Growing Dyes for Natural Fibers*. Interweave Press, Loveland (1995) ISBN: 1883010071.
- McRae B. A.: *Colors from Nature: Growing, Collecting and Using Natural Dyes*. Garden Way Publishing Co Pownal (1993) ISBN: 0882667998.
- Epp D. N.: *The Chemistry of Natural Dyes (Palette of Color Series)*. Terrific Science Press, Middletown (1995) ISBN: 1883822068.
- <http://spectra.galactic.com/SpectraOnline/about/collections.htm>, staženo 15.10.04.
- http://www.aist.go.jp/RIODB/SDBS/sdbs/owa/sdbs_sea_cre_frame_sea, staženo 15.10.04.
- <http://www.aist.go.jp/RIODB/SDBS/menu-e.html>, staženo 15.10.04.
- <http://www.lohninger.com/spectroscopy/dball.html>, staženo 15.10.04.
- <http://www.nist.gov/srd/online.htm>, staženo 15.10.04.
- <http://www.spectroscopynow.com/>, staženo 15.10.04.
- <http://www.gsu.edu/~mstnrhx/edsc84/dye.htm>, staženo 15.10.04.
- <http://www.danielsmith.com/learn/inksmith/200211/>, staženo 15.10.04.
- <http://www.ajantacolours.com/prod.htm>, staženo 15.10.04.
- <http://wwwchem.uwimona.edu.jm:1104/lectures/ecode.html>, staženo 15. 10. 2004.
- <http://www.foodcolour.com/>, staženo 15.10.04.
- <http://www.neelikon.com/foodcol.htm>, staženo 15.10.04.
- <http://www.standardcon.com/food%20colohttp://www.rohadyechem.com/index1.shtml>, staženo 15.10.04.
- <http://www.ukfoodguide.net/enumeric.htm>, staženo 15.10.04.
- <http://www.agsci.ubc.ca/courses/fnh/410/modules.htm#Colour>, staženo 15.10.04.
- <http://www.raise.org/natural/pubs/dyes/annex.stm>, staženo 15.10.04.
- <http://www.dyeman.com/NATURAL-DYES.html>, staženo 15.10.04.
- <http://www.2k-software.de/ingo/farbe/farbchemie.html>, staženo 15.10.04.
- The Merck Index*, 13th Ed., Merck & Co. Inc., Whitehouse Station, 2001, electronic version by CambridgeSoft, Cambridge.
- ACD/Dictionary*, ver. 8.08, ACD/Labs, Toronto, 2004.
- Kodíček M.: *Biochemické pojmy, výkladový slovník*, VŠCHT Praha, verze 1.0, 2004, http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/, staženo 1.8.05.
- Paulová H., Bochořáková H. Táborská E.: Chem. Listy 98, 174 (2004).
- Lachman J., Hamouz K., Orsák M.: Chem. Listy 99, 474 (2005).
- Chlupáčová M., Opletalová V.: Chem. Listy 99, 320 (2005).
- Vítková M., Macková Z., Fukal L., Lapčík O.: Chem. Listy 99, 1135 (2005).
- Chen P.C., Huang C.C.: Huaxue 52, 127-32 (1994), Chem. Abstr. 122, 293389 (1995).

J. Čopíková^a, M. Uher^b, O. Lapčík^c, J. Moravcová^c, and P. Drašar^{c,d} (^a Department of Carbohydrate Chemistry and Technology, Institute of Chemical Technology, Prague, ^b Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak Technical University, Bratislava, ^c Department of Chemistry of Natural Compounds, Institute of Chemical Technology, Prague, ^d Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague): **Natural Colorants**

A brief survey of the most frequently occurring natural colorants aims to show the importance of this group of renewable materials, which can be utilised, among others, in food and pharmaceutical industry. The beauty and biodiversity of this group of mostly secondary metabolites are illustrated.

AUTORSKÝ REJSTŘÍK

Astrová, Martina	198
Bárta, Jan	138
Basařová, Gabriela	144
Benešová, Eva	204
Branny, Pavel	63
Buckiová, Daniela	32
Čuboňová, Lubomíra	123
Čepička, Jaroslav	41
Černý, Miloslav	59
Červený, Libor	198
Čopíková, Jana	239, 264
Čurn, Vladislav	138
Doležalová, Ivana	76
Dostálek, Pavel	144
Drašar, Pavel	264
Dziechciarková, Marta	76
Entnerová, Pavla	167
Filip, Vladimír	32, 219
Forejtníková, Hana	115
Frček, Jan	24
Frei, Eva	17, 257
Greplová, Marie	76
Hájíček, Josef	151, 178
Hamouz, Karel	210
Hanzlíková, Irena	32
Harmatha, Juraj	228
Hofta, Pavel	144
Innemanová, Petra	240
Jegorov, Alexandr	55
Jiráček, Jiří	247
Karabín, Marcel	41
Kasal, Alexander	85
Kleinová, Tereza	47
Kohout, Ladislav	40
Kolouchová, Irena	219
Kotyk, Arnošt	223
Kozler, Josef	240
Králová, Blanka	204
Křísa, Bohdan	32
Kubal, Martin	240
Kubínová, Renata	115
Kurc, Ladislav	198
Lachman, Jaromír	210
Lapčík, Oldřich	264
Lebeda, Aleš	76
Lipovová, Petra	204
Marková, Michaela	204
Melzoch, Karel	32, 219
Migáň, Peter	123
Modrianská, Martin	68
Moravcová, Jitka	7, 47, 264
Opatová, Hana	76
Orsák, Matyáš	210
Pacák, Josef	59
Patočka, Jiří	128, 257
Pour, Milan	106
Přikrylová, Věra	68
Ruml, Tomáš	63
Sedláčková, Lucie	63
Schmieser, Heinz H.	257
Slanina, Jiří	131
Stiborová, Marie	17, 128, 257
Synitsya, Andrii	239

Šimánek, Vilím	167
Šmidrkal, Jan	32, 219
Táborská, Eva	131
Uher, Michal	264
Ulrichová, Jitka	24, 76
Urbaníková, Jaroslava	167
Valentová, Kateřina	24, 68, 76, 167
Večeřa, Zbyněk	1
Veselá, Lenka	240
Větvicka, Václav	150
Vítek, Libor	63
Walterová, Daniela	68
Žabka, Martin	55
Žáková, Lenka	247

